

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARLUS BUENO SILVA

COFILOGEOGRAFIA: ESTRUTURAÇÃO GEOGRÁFICA, DEMOGRAFIA HISTÓRICA  
E ASSOCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE *Gyrodactylus* (MONOGENOIDEA:  
GYRODACTYLIDAE) E HOSPEDEIROS *Scleromystax* (SILURIFORMES:  
CALLICHTHYIDAE)

CURITIBA  
2011

MARLUS BUENO SILVA

COFILOGEOGRAFIA: ESTRUTURAÇÃO GEOGRÁFICA, DEMOGRAFIA HISTÓRICA  
E ASSOCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE *Gyrodactylus* (MONOGENOIDEA:  
GYRODACTYLIDAE) E HOSPEDEIROS *Scleromystax* (SILURIFORMES:  
CALLICHTHYIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em  
Ciências, área de concentração Zoologia.  
Orientador: Walter Antonio Pereira Boeger, Ph.D.

CURITIBA  
2011

Termo de aprovação


por

**MARLUS BUENO SILVA**

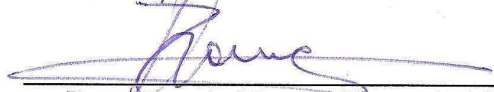
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:




Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR  
Presidente e Orientador



Dr. Rogério Tubino Vianna – UFSC



Dra. Vanete Thomaz Soccol - UP



Dra. Valéria Cunha Muschner – UFPR



Dra. Edilene Alcântara de Castro - UFPR

Curitiba, 27 de maio de 2011.

*“All religions, arts and sciences are branches of the same tree.”*

Albert Einstein



## SUMÁRIO

Termo de aprovação .....	iii
Epígrafe .....	iv
Lista de Figuras .....	viii
Lista de Tabelas .....	xi
Agradecimentos .....	xiv
Introdução Geral .....	xv
Referências .....	xix
Resumo Geral .....	xxiii
Abstract .....	xxvi

### **Capítulo I.** Gene mitocondrial citocromo oxidase II: um potencial marcador molecular para código de barras genético de Gyrodactylidae vivíparos (Monogenoidea)

Resumo .....	1
Abstract .....	2
Introdução .....	4
Materiais e Métodos .....	5
Resultados e Discussão .....	9
Referências .....	11

### **Capítulo II.** Quatro espécies novas de *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) de *Scleromystax* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) do sul do Brasil

Resumo .....	22
Abstract .....	23
Introdução .....	25

Materiais e Métodos .....	25
Resultados .....	28
Discussão .....	35
Referências .....	37

**Capítulo III.** Cofilogeografia: avaliando a estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea: Gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (Siluriformes: Callichthyidae) no sul do Brasil

Resumo .....	57
Abstract .....	58
1. Introdução .....	60
2. Materiais e Métodos .....	63
2.1. Área de estudo e coleta de amostras .....	63
2.2. Estudo morfométrico .....	64
2.2.1. Hospedeiros .....	64
2.2.2. Parasitos .....	65
2.3. Estudo molecular .....	66
2.3.1. Hospedeiros .....	66
2.3.2. Parasitos .....	67
2.3.3. Análise filogenética .....	68
3. Resultados .....	73
3.1. Identificação das espécies parasitas .....	73
3.2. Estudo morfométrico .....	73
3.2.1. Hospedeiros .....	73
3.2.2. Parasitos .....	75

3.3. Estudo molecular .....	76
3.3.1. Hospedeiros .....	76
3.3.2. Parasitos .....	80
3.3.3. Associação parasito-hospedeiro .....	86
4. Discussão .....	87
4.1. Associação parasito-hospedeiro e adaptação morfológica em parasitos .....	87
4.2. Variabilidade genética parasito-hospedeiro: estruturação geográfica, codivergência adaptativa e demografia histórica .....	88
4.3. Variabilidade morfológica parasito-hospedeiro: variação fenotípica entre populações .....	95
5. Conclusões .....	97
Referências .....	100

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

<b>Figura 1.</b> Imagem de satélite do estado do Paraná e estado de São Paulo, mostrando a área de estudo .....	17
<b>Figuras 2–4.</b> Produtos de PCR obtidos com oligonucleotídeos iniciadores de <i>coxI</i> e <i>coxII</i> para espécimes de <i>Gyrodactylus</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> Dendograma da análise de “neighbor-joining” das sequências de <i>coxII</i> de 18 espécies de sete famílias de Monogenoidea .....	19

### Capítulo II

<b>Figura 1.</b> Imagem de satélite da baía de Paranaguá, estado do Paraná, mostrando a área de estudo .....	43
<b>Figuras 2–3.</b> Distâncias morfométricas de estruturas esclerotizadas do háptor de <i>Gyrodactylus</i> .....	44
<b>Figura 4.</b> Análise discriminante de medidas de âncora e gancho de espécies de <i>Gyrodactylus</i> de <i>Scleromystax barbatus</i> e <i>Scleromystax macropterus</i> .....	45
<b>Figura 5.</b> Dendogramas da análise de “neighbor-joining” das sequências de <i>coxII</i> e ITS1–ITS2 de espécies de <i>Gyrodactylus</i> .....	46
<b>Figuras 6–10.</b> Morfologia geral de <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 1 .....	47
<b>Figuras 11–15.</b> Morfologia geral de <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 2 .....	48
<b>Figuras 16–20.</b> Morfologia geral de <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3 .....	49
<b>Figuras 21–24.</b> Morfologia geral de <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4 .....	50
<b>Figuras 25–32.</b> Imagens de microscopia óptica de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	51

### Capítulo III

<b>Figura 1.</b> Imagem de satélite da baía de Paranaguá, estado do Paraná, mostrando a área de estudo .....	120
<b>Figura 2.</b> Distâncias morfométricas obtidas para os hospedeiros <i>Scleromystax barbatus</i> e <i>Scleromystax macropterus</i> .....	121
<b>Figura 3.</b> Dendograma da análise de cluster baseada nas distâncias morfométricas de âncoras e ganchos de espécies de <i>Gyrodactylus</i> .....	122
<b>Figura 4.</b> Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada no gene SRP54, mostrando o relacionamento filogenético de populações de <i>Scleromystax</i> .....	123
<b>Figura 5.</b> Estrutura secundária de D-loop de <i>Scleromystax barbatus</i> .....	124
<b>Figura 6.</b> Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada em D-loop, mostrando o relacionamento filogenético de populações de <i>Scleromystax</i> .....	125
<b>Figura 7.</b> Demografia histórica de populações de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	126
<b>Figura 8.</b> Estrutura secundária de espaçador interno transcrito 2 (ITS2) de espécies de <i>Gyrodactylus</i> .....	128
<b>Figura 9.</b> Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada no gene ZMP, mostrando o relacionamento filogenético de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> .....	131
<b>Figura 10.</b> Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada no gene COII, mostrando o relacionamento filogenético de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> .....	132
<b>Figura 11.</b> Cladograma enraizado da análise bayesiana baseada nas sequências de aminoácidos de COII de espécies de <i>Gyrodactylus</i> .....	133
<b>Figura 12.</b> Demografia histórica de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> .....	134
<b>Figura 13.</b> Análise comparativa da história demográfica de espécies de <i>Gyrodactylus</i> e <i>Scleromystax</i> .....	138
<b>Figura 14.</b> Mapeamento da especificidade ao hospedeiro de espécies de <i>Gyrodactylus</i> .....	139

<b>Figura 15.</b> Análise da distribuição de espécies de <i>Gyrodactylus</i> entre <i>Scleromystax</i> <i>barbatus</i> e <i>Scleromystax macropterus</i> .....	140
---	-----

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Lista de espécies usadas na inferência filogenética de Monogenoidea com base no gene mitocondrial citocromo oxidase II .....	20
---	----

<b>Tabela 2.</b> Divergência nucleotídica entre espécies de Monogenoidea com base no gene mitocondrial citocromo oxidase II .....	21
---	----

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Valores médios das distâncias morfométricas de âncora e gancho de quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	52
---	----

<b>Tabela 2.</b> Autovalores da matriz de correlação da PCA de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	53
--	----

<b>Tabela 3.</b> Escores da PCA de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	54
--	----

<b>Tabela 4.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de âncora e gancho de quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	55
--	----

<b>Tabela 5.</b> Divergência nucleotídica de <i>coxII</i> e ITS1–ITS2 entre quatro espécies novas de <i>Gyrodactylus</i> .....	56
--	----

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Ocorrência, prevalência e intensidade média de quatro espécies de <i>Gyrodactylus</i> de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	141
--	-----

<b>Tabela 2.</b> Valores médios das distâncias morfométricas de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	142
--	-----

<b>Tabela 3.</b> Autovalores da matriz de covariância da PCA das distâncias morfométricas de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	143
<b>Tabela 4.</b> Escores da PCA das distâncias morfométricas de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	144
<b>Tabela 5.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de <i>Scleromystax macropterus</i> e <i>Scleromystax barbatus</i> .....	145
<b>Tabela 6.</b> Autovalores da matriz de covariância da PCA das distâncias morfométricas de populações de <i>Scleromystax barbatus</i> .....	146
<b>Tabela 7.</b> Escores da PCA das distâncias morfométricas de populações de <i>Scleromystax barbatus</i> .....	147
<b>Tabela 8.</b> Análise multivariada de variância (MANOVA) das distâncias morfométricas de populações de <i>Scleromystax barbatus</i> .....	148
<b>Tabela 9.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de populações de <i>Scleromystax barbatus</i> de sub-bacias distintas .....	149
<b>Tabela 10.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de populações de <i>Scleromystax barbatus</i> de rios distintos .....	150
<b>Tabela 11.</b> Autovalores da matriz de correlação da PCA das distâncias morfométricas de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3 .....	151
<b>Tabela 12.</b> Escores da PCA das distâncias morfométricas de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3 .....	152
<b>Tabela 13.</b> Análise multivariada de variância (MANOVA) das distâncias morfométricas de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3 .....	153
<b>Tabela 14.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3 de sub-bacias distintas .....	154
<b>Tabela 15.</b> Análise discriminante das distâncias morfométricas de suprapopulações de <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3 de rios distintos .....	155



**Tabela 16.** Divergência nucleotídica de COII, ZMP e ITS1–ITS2 entre quatro espécies de

*Gyrodactylus* ..... 156

**Tabela 17.** Tamanho de fragmentos de éxons e íntron do gene ZMP de três espécies de

*Gyrodactylus* ..... 157

**Tabela 18.** Teste de neutralidade baseado nos códons de COII de haplótipos de quatro

espécies de *Gyrodactylus* ..... 158

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Rute, e ao meu irmão, Daniel, pelo apoio, carinho e cuidado durante todos esses anos.

Aos queridos Dr. Leocádio Correia e Marina Fidélis pela amizade, cuidado, incentivo e por suas belas mensagens construtivas.

Ao meu orientador, prof. Walter Boeger, pela oportunidade de aprendizado, confiança e dedicação.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE–UFPR) pela amizade, momentos de alegria, aprendizado e apoio.

Aos professores e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Zoologia da UFPR pela dedicação e atenção.

Aos colegas de pós-graduação que me acompanharam todos esses anos, dando-me incentivo e suporte.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

A TODOS vocês, meu sincero agradecimento!

## INTRODUÇÃO GERAL

Os Monogenoidea representam um diverso grupo de parasitos de peixes, amplamente distribuído no mundo. Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863 inclui todas as espécies vivíparas conhecidas dessa classe. Nessa família, *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 é o gênero com maior número de espécies conhecidas, das quais algumas são consideradas uma séria ameaça à manutenção de populações de peixes (McVicar, 1997; Boeger et al., 2003; Bakke et al., 2002, 2007).

A ampla diversificação de *Gyrodactylus* resulta da combinação de características biológicas (e.g. hiperviviparidade e curto tempo de geração) que contribuem para a conquista de novos hospedeiros e dispersão entre ambientes geográficos distintos (Bakke et al., 2002; Cable e Harris, 2002; Morand et al., 2002; Boeger et al., 2003).

Alguns estudos têm evidenciado que a interação coevolutiva entre parasitos e hospedeiros depende não apenas de fatores ecológicos e genéticos, mas também geográficos (Kaltz e Shykoff, 1998; Thompson, 1999; Gandon e Michalakis, 2002; Dybdahl e Storfer, 2003; Prugnolle et al., 2005). A estruturação geográfica define a diversidade de padrões ecológicos e a dinâmica de coevolução das espécies, promovendo a adaptação local das populações (Thompson, 1999, 2005). Além disso, a estruturação geográfica é considerada um dos principais fatores determinantes da diversificação, adaptação local e composição de comunidades de parasitos (Poulin e Morand, 1999; Thompson, 1999; Gandon e Michalakis, 2002; Dybdahl e Storfer, 2003; Prugnolle et al., 2005; Nuismer, 2006). Embora o processo de diversificação de *Gyrodactylus* seja amplamente reconhecido (Morand et al., 2002; Ziętara e Lumme, 2002; Boeger et al., 2003; Meinilä et al., 2004; Bueno-Silva et al., 2011), pouco se conhece sobre o papel da estruturação geográfica nesse contexto (Malmberg, 1970; Dmitrieva e Dimitrov, 2002; Meinilä et al., 2004).

Na região Neotropical, são conhecidas cerca de 40 espécies de Gyrodactylidae, das quais aproximadamente 20 são de *Gyrodactylus* (Boeger et al., 2006; Kritsky et al., 2007; Cohen e

Kohn, 2008). No estado do Paraná (Brasil), são conhecidas quatro espécies de *Gyrodactylus* que compartilham espécies simpátricas de Callichthyidae (Popazoglo e Boeger, 2000; Bueno-Silva e Boeger, 2009). Essas espécies têm servido como modelo parasito-hospedeiro (Boeger et al., 2005; Bueno-Silva et al., 2011) para testar hipóteses sobre a diversificação e adaptação de espécies de *Gyrodactylus* (Boeger et al., 2003). De forma experimental (Boeger et al., 2005) e empírica (Bueno-Silva et al., 2011), esses estudos demonstraram que *Gyrodactylus* é capaz de explorar espécies distintas de hospedeiros em simpatria. Além disso, os resultados desses estudos corroboraram a hipótese de Boeger et al. (2003), de que a diversificação de *Gyrodactylus* está relacionada à conquista de um novo hospedeiro ou ambiente geográfico, o que poderia fornecer subsídios para compreender o papel da estruturação geográfica na relação parasito-hospedeiro e na diversidade genética e morfológica das populações.

O estudo da relação parasito-hospedeiro é uma das principais formas de avaliar a adaptação local das espécies em ambientes geograficamente heterogêneos, já que o parasitismo é variável temporalmente e entre populações de hospedeiros (Thompson, 1999, 2005). De acordo com Thompson (1999), a variação espacial na interação parasito-hospedeiro é uma das maiores forças geradoras de diversidade biológica e contribui para seleção em mosaico (e.g. pressões seletivas atuando de forma diferenciada entre populações geograficamente isoladas). Os padrões de diferenciação genética em pequena escala espacial podem contribuir com informações sobre o modo de dispersão e dinâmica evolutiva de espécies parasitas. Como as interações coevolutivas podem ser altamente divergentes no espaço e tempo, é importante quantificar e comparar a variação filogeográfica de parasitos e hospedeiros em sua extensão geográfica (Huyse et al., 2005). Partindo dessa premissa, esse estudo tem como objetivo avaliar a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversidade morfológica e associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. em duas sub-bacias da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil. A escolha da área de estudo foi realizada com base no pressuposto de que as

características topográficas e a história geomorfológica da região (Bigarella, 2001; Maack, 2001) poderiam contribuir para testar hipóteses de filogeografia e genética de populações.

Com base em estudos sobre dinâmica coevolutiva parasito-hospedeiro (Thompson, 1999; Desdevise et al., 2002; Huyse et al., 2003; Nieberding et al., 2004; Huyse e Volckaert, 2005), o estudo propõe responder as seguintes perguntas: (i) A associação parasito-hospedeiro varia entre populações geograficamente isoladas? (ii) O isolamento geográfico das populações reflete a codivergência adaptativa de linhagens de parasitos e seus hospedeiros? (iii) O grau de diferenciação genética e morfológica está relacionado ao isolamento geográfico das populações? (iv) A história demográfica das populações de parasitos é congruente com a de seus hospedeiros?

De acordo com Page e Charleston (1998), a interação parasito-hospedeiro resulta de uma longa história coevolutiva das espécies. Em cada associação, uma espécie interage com outra em um nível de fidelidade dependente da frequência relativa de quatro categorias de eventos: codivergência, duplicação, transferência horizontal e extinção. Com base nessas observações, é possível hipotetizar que: (i) a associação parasito-hospedeiro poderia diferir entre populações de regiões distintas se as condições locais favorecessem eventos de troca de hospedeiro; (ii) o baixo fluxo gênico entre populações geograficamente distantes contribuiria para eventos de codivergência adaptativa (e.g. linhagens de parasitos associados a hospedeiros locais); (iii) à medida que o isolamento geográfico reduz a probabilidade de fluxo gênico entre populações, esperaria-se que o grau de diversificação genética e morfológica seja proporcional à distância geográfica entre as populações; (iv) quanto mais íntima a relação parasito-hospedeiro (e.g. associação histórica), maior seria a probabilidade de que as espécies associadas apresentassem histórias demográficas congruentes entre si (e.g. coespeciação).

O estudo foi dividido em três capítulos:

❖ **Capítulo I. Gene mitocondrial citocromo oxidase II: um potencial marcador molecular para código de barras genético de Gyrodactylidae vivíparos (Monogenoidea).** Nesse capítulo, foram desenvolvidos oligonucleotídeos iniciadores

para amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase II (COII) de espécies de Gyrodactylidae. Os resultados permitiram reconhecer a utilidade desse gene como um marcador molecular alternativo para código de barras genético e estudos filogenéticos com Gyrodactylidae vivíparos e, até mesmo, com espécies de várias outras famílias de Monogenoidea.

❖ **Capítulo II. Quatro espécies novas de *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) de *Scleromystax* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) do sul do Brasil.** Nesse capítulo, foram reconhecidas e descritas quatro novas espécies neotropicais de *Gyrodactylus* de duas espécies de peixes Siluriformes do sul do Brasil, *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard, 1824). Duas dessas espécies parasitas (*Gyrodactylus* sp. n. 1 e *Gyrodactylus* sp. n. 2) ocorreram, em sua maioria, em *S. macropterus*, enquanto que *Gyrodactylus* sp. n. 3 ocorreu principalmente em *S. barbatus*. *Gyrodactylus* sp. n. 4, porém, foi encontrada apenas em *S. barbatus*. O status taxonômico das espécies novas de *Gyrodactylus* foi confirmado com a ajuda de técnicas morfométricas e moleculares.

❖ **Capítulo III. Cofilogeografia: avaliando a estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea: Gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (Siluriformes: Callichthyidae) no sul do Brasil.** Nesse capítulo, foi avaliada a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversidade morfológica e associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. em duas sub-bacias da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil. O conjunto de dados genéticos e morfométricos de populações de *Scleromystax* e *Gyrodactylus* revelou que a estruturação geográfica é um fator determinante da diversificação genética, morfológica e, possivelmente, da adaptação local parasito-hospedeiro.

## Referências

- Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., 2007. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian doll-killers”. *Adv. Parasitol.* 64, 161-376.
- Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.* 32, 281-308.
- Bigarella, J.J., 2001. Contribuição ao estudo da planície litorânea do estado do Paraná. *Braz. Arch. Biol. Technol. Jubilee volume (1946-2001)*, 65-110.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., 2003. Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). *Zool. Scr.* 32, 437-448.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., Engers, K.B., 2005. Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogenoidea). *J. Parasitol.* 91, 1000-1007.
- Boeger, W.A., Vianna, R.T., Thatcher, V.E., 2006. Monogenoidea. In: J. Adis, J.R. Arias, G. Rueda-Delgado and K.M. Wantzen (Eds.), *Aquatic Biodiversity in Latin America. Vol. 1. Amazon Fish Parasites. Second edition.* Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria, pp. 42-116.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A., 2009. Neotropical Monogenoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidae: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. *Folia Parasitol.* 56, 13-20.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A., Pie, M.R., 2011. Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.* 41, 657-667.
- Cable, J., Harris, P.D., 2002. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *Int. J. Parasitol.* 32, 255-280.
- Cohen, S.C., Kohn, A., 2008. South American Monogenea – list of species, hosts and geographical distribution from 1997 to 2008. *Zootaxa* 1924, 1-42.

- Desdevises, Y., Morand, S., Jousson, O., Legendre, P., 2002. Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. *Evolution* 56, 2459-2471.
- Dmitrieva, E., Dimitrov, G., 2002. Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 51, 199-206.
- Dybdahl, M.F., Storfer, A., 2003. Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends Ecol. Evol.* 18, 523-530.
- Gandon, S., Michalakis, Y., 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J. Evol. Biol.* 15, 451-462.
- Huyse, T., Audenaert, V., Volckaert, F.A.M., 2003. Speciation and host-parasite relationships in the genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). *Int. J. Parasitol.* 33, 1679-1689.
- Huyse, T., Poulin, R., Théron, A., 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 21, 469-475.
- Huyse, T., Volckaert, F.A.M., 2005. Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from Goby to Goby. *Syst. Biol.* 54, 710-718.
- Kaltz, O., Shykoff, J.A., 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* 81, 361-370.
- Kritsky, D.C., Vianna, R.T., Boeger, W.A., 2007. Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with proposal of *Phanerothecioides* n. gen., *Onychogyrodactylus* n. gen. and *Agelaiogyrodactylus* n. gen. (Polyonchoinea, Gyrodactylidea). *Syst. Parasitol.* 66, 1-34.
- Maack, R., 2001. Breves Notícias Sobre a Geologia dos Estados do Paraná e Santa Catarina. *Braz. Arch. Biol. Technol.* Jubilee volume (1946-2001), 169-288.
- Malmberg, G., 1970. The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematic of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool.* 23, 1-235.



- McVicar, A.H., 1997. Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. *J. Mar. Sci.* 54, 1093-1103.
- Meinilä, M., Kuusela, J., Ziętara, M.S., Lumme, J., 2004. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.* 34, 515-526.
- Morand, S., Simková, A., Matejusová, I., Plaisance, L., Verneau, O., Desdevises, Y., 2002. Investigating patterns may reveal processes: evolutionary ecology of ectoparasitic monogeneans. *Int. J. Parasitol.* 32, 111-119.
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., Michaux, J.R., 2004. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 2559-2568.
- Nuismer, S.L., 2006. Parasite local adaptation in a geographic mosaic. *Evolution* 60, 24-30.
- Page, R.D.M., Charleston, M.A., 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. *Tree* 13, 356-359.
- Popazoglo, F., Boeger, W.A., 2000. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of southern Brazil. *Folia Parasitol.* 47, 105-110.
- Poulin, R., Morand, S., 1999. Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations. *Parasitology* 119, 369-374.
- Prugnolle, F., Theron, A., Pointier, J.P., Jabbour-Zahab, R., Jarne, P., Durand, P., de Meeûs, T., 2005. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution* 59, 296-303.
- Thompson, J.N., 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *Am. Nat.* 153, S1-S14.
- Thompson, J.N., 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago.

Ziętara, M.S., Lumme, J., 2002. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution* 56, 2445-2458.

## RESUMO GERAL

O objetivo principal desse estudo foi avaliar a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversificação morfológica e associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. em sub-bacias litorâneas do estado do Paraná, Brasil. Assim, o estudo foi dividido em três capítulos. No primeiro capítulo, foi proposto um marcador molecular alternativo para estudos com espécies de Gyrodactylidae vivíparos. Gyrodactylidae representa uma família de ectoparasitos de peixes marinhos e dulcícolas amplamente distribuída. Embora a identificação desses parasitos seja baseada essencialmente na morfologia de estruturas esclerotizadas do háptor, tais estruturas podem apresentar variação na forma e tamanho em diferentes condições bióticas e abióticas, causando confusão taxonômica na delimitação das espécies. Parte desse problema tem sido resolvido com a ajuda de marcadores moleculares, especialmente os espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1–ITS2) e o gene mitocondrial citocromo oxidase I (*coxI*), que têm facilitado a identificação de espécies de *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832. Porém, as diferenças interespecíficas em ITS são altamente variáveis, o que dificulta a delimitação de espécies baseada somente nesse marcador. Por outro lado, o marcador *coxI* tem demonstrado maior precisão na delimitação de espécies e linhagens de *Gyrodactylus* devido à acelerada taxa evolutiva do DNA mitocondrial. Contudo, os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam *coxI* não funcionam adequadamente para algumas espécies de *Gyrodactylus*, aparentemente devido à variabilidade molecular interespecífica. Além disso, a amplificação de *coxI* pode se tornar difícil porque requer a combinação de vários iniciadores. Por essa razão, foi proposto um marcador molecular alternativo, o gene mitocondrial citocromo oxidase II (*coxII*), para estudos com espécies de Gyrodactylidae vivíparos. O sucesso de amplificação de amostras de *Gyrodactylus* com os iniciadores de *coxII* ( $n = 15$ ) foi consideravelmente maior do que com os iniciadores disponíveis de *coxI* ( $n = 3$ ) e resultou em 15 sequências de ótima qualidade (~560 pb). O resultado da análise filogenética de *Gyrodactylus* spp., baseada em sequências de *coxII*,

corroborou a prévia identificação morfológica das espécies e apresentou valores de suporte de ramo entre 97–100%. O sucesso na amplificação de espécies de outras famílias sugere que os iniciadores de *coxII* podem ser úteis, ainda, em estudos filogenéticos e populacionais de outros grupos de Monogenoidea. No segundo capítulo, foram descritas quatro novas espécies de *Gyrodactylus* da superfície corporal de duas espécies de Siluriformes (Callichthyidae) do sul do Brasil, *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard, 1824). Foram usados dois conjuntos de técnicas, morfométricas e moleculares, para subsidiar a proposta das novas espécies parasitas. Nove distâncias morfométricas de âncora e gancho foram avaliadas por análise discriminante e MANOVA. A análise morfométrica revelou diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) em oito medidas, as quais permitiram reconhecer quatro espécies novas de *Gyrodactylus* com 100% de precisão. Essas espécies podem ser distinguidas de outras espécies neotropicais de *Gyrodactylus* com base na morfologia de âncoras e ganchos. A análise molecular dos fragmentos de *coxII* e ITS1–ITS2 corroborou a identidade das novas espécies de *Gyrodactylus*. No terceiro capítulo, foi avaliada a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversificação morfológica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*. Espécimes adultos de *S. macropterus* e *S. barbatus* foram coletados em rios das sub-bacias da baía de Paranaguá e do rio Nhundiaquara. Foram coletados 313 espécimes de quatro espécies novas de *Gyrodactylus*. Nove distâncias morfométricas de parasitos e de hospedeiros foram analisadas. A análise desses dados revelou diferenças morfométricas significativas entre populações de hospedeiros ( $P < 0,001$ ) e de parasitos ( $P < 0,001$ ) entre diferentes rios e sub-bacias. Fragmentos de DNA nuclear e mitocondrial foram sequenciados para *Gyrodactylus* spp. (genes ZMP e *coxII*) e *Scleromystax* spp. (D-loop e gene SRP54). O relacionamento filogenético baseado nessas sequências de DNA forneceu suporte para linhagens de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*, as quais refletiram a distribuição geográfica das populações. A análise da associação parasito-hospedeiro revelou a alta especificidade de *Gyrodactylus* spp., porém os resultados sugerem que variações locais na interação parasito-hospedeiro estão mais

relacionadas com eventos de troca de hospedeiro do que com o isolamento geográfico das populações. A reconstrução das datas de divergência (relógio molecular) para espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* descartou a possibilidade de coespeciação parasito-hospedeiro. No entanto, a história demográfica de *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. sugere que retrações e expansões populacionais recentes estão associadas a flutuações climáticas do Período Quaternário. Os dados genéticos e morfométricos de *Scleromystax* e *Gyrodactylus* sugerem, portanto, que a estruturação geográfica é um fator determinante da diversificação genética, morfológica e, possivelmente, da adaptação local parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the influence of geographic structuring in the molecular evolution, morphological diversification and association between *Gyrodactylus* spp. and *Scleromystax* spp. in sub-basins of the coastal state of Paraná, Brazil. Thus, the study was divided into three chapters. In the first chapter, we propose an alternative molecular marker for studies on *Gyrodactylus* (and other genera of viviparous Gyrodactylidae). Gyrodactylidae represents a family of ectoparasites found on freshwater and marine bony fishes worldwide. The identification of these parasites is mainly based on the morphology of haptoral sclerites. However, haptoral sclerites may show morphological variations in shape and size under different biotic and abiotic conditions, which could cause confusion in the taxonomic delimitation of species. The usage of molecular markers of DNA has solved part of this issue, especially the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1–ITS2) and the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (*coxI*), which have been useful on the identification of species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832. However, differences in the ITS sequences are highly variable among species of *Gyrodactylus* and it is difficult to establish an unambiguous limit between species based only on ITS. On the other hand, the *coxI* has shown greater accuracy in the delimitation of species and lineages of *Gyrodactylus* because of the accelerated evolutionary rate of mitochondrial DNA. Nevertheless, the *coxI* primers do not work properly for some species of *Gyrodactylus*, apparently due to the interspecific molecular variability. In addition, the amplification of *coxI* could be difficult because it requires the combination of many primers. For that reason, we propose an alternative molecular marker, the mitochondrial cytochrome oxidase II gene (*coxII*), for studies on viviparous Gyrodactylidae. The success of DNA amplification of *Gyrodactylus* spp. with *coxII* primers was considerably greater than that performed with *coxI* primers. The amplification of *coxII* resulted in sequences of high quality (~560 bp). The phylogenetic analysis of *Gyrodactylus* spp., based on sequences of *coxII*, confirmed the previous morphological

identification of the species and showed branch support values between 97–100%. The successful DNA amplification of species from other families suggests that the primers of *coxII* may be useful in phylogenetic and population studies of other groups of Monogenoidea. In the second chapter, we describe four new species of *Gyrodactylus* from the body surface of two species of Siluriformes (Callichthyidae) from southern Brazil, *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) and *Scleromystax barbatus* (Quoy and Gaimard, 1824). We used two sets of morphological and molecular techniques to support the proposal of new species of *Gyrodactylus*. Nine morphometric features of the anchors and hooks were measured and analysed by discriminant analysis and MANOVA. The morphometric analysis revealed significant differences ( $P < 0.001$ ) in eight measurements, which allowed us to recognize four new species of *Gyrodactylus* with 100% accuracy. These species could be distinguished from other Neotropical species of *Gyrodactylus* by the morphology of anchors and hooks. The molecular analysis of sequences of *coxII* and ITS1–ITS2 confirmed the identity of the new species of *Gyrodactylus*. In the third chapter, we evaluate the influence of geographic structuring in the molecular evolution, morphological diversification and association between species of *Gyrodactylus* and *Scleromystax*. Adult specimens of *S. macropterus* e *S. barbatus* were collected from rivers of the sub-basins of Paranaguá Bay and the Nhundiaquara River. We collected 313 specimens of four new species of *Gyrodactylus*. Nine morphometric features of parasites and hosts were analyzed. The data revealed significant morphometric differences for populations of hosts ( $P < 0.001$ ) and parasites ( $P < 0.001$ ) from different rivers and sub-basins. Fragments of nuclear and mitochondrial DNA were sequenced for *Gyrodactylus* spp. (ZMP and *coxII* genes) and *Scleromystax* spp. (D-loop and SRP54 gene). The phylogenetic analysis based on these DNA sequences provided support for lineages of *Gyrodactylus* and *Scleromystax*, which reflected the geographical distribution of populations. The analysis of host-parasite association revealed the high specificity of *Gyrodactylus* spp. but the results suggest that local variations in the parasite-host interaction are more related to host-switching events than to geographical isolation of

populations. Reconstruction of divergence dates (molecular clock) for species of *Gyrodactylus* and *Scleromystax* rejects the hypothesis of host-parasite cospeciation. However, the demographic history of *Gyrodactylus* spp. and *Scleromystax* spp. suggests that recent population expansions and declines are associated to climatic fluctuations of the Quaternary Period. Morphometric and genetic data of *Gyrodactylus* and *Scleromystax* suggest that the geographic structuring is a determinant factor of genetic and morphologic diversification, and possibly the host-parasite local adaptation.



## CAPÍTULO I

### **Gene mitocondrial citocromo oxidase II: um potencial marcador molecular para código de barras genético de *Gyrodactylidae* vivíparos (Monogenoidea) <sup>(\*)</sup>**

Título abreviado: Código de barras genético para *Gyrodactylidae*

#### **Resumo**

*Gyrodactylidae* representa uma família de ectoparasitos de peixes marinhos e dulcícolas amplamente distribuída. A identificação desses parasitos é baseada essencialmente na morfologia de estruturas esclerotizadas do háptor. Entretanto, essas estruturas podem apresentar variação na forma e tamanho em diferentes condições bióticas e abióticas, causando confusão taxonômica na delimitação das espécies. Parte desse problema tem sido resolvido com a ajuda de marcadores moleculares, especialmente os espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1–ITS2) e o gene mitocondrial citocromo oxidase I (*coxI*), que têm facilitado a identificação de espécies de *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832. Porém, as diferenças interespecíficas em ITS são altamente variáveis, o que dificulta a delimitação de espécies baseada somente nesse marcador. Por outro lado, o marcador *coxI* tem demonstrado maior precisão na delimitação de espécies e linhagens de *Gyrodactylus* devido à acelerada taxa evolutiva do DNA mitocondrial. Contudo, os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam *coxI* não funcionam adequadamente para algumas espécies de *Gyrodactylus*, aparentemente devido à variabilidade molecular interespecífica. Além disso, a amplificação de *coxI* pode se tornar difícil, pois requer a combinação de vários iniciadores em função da

---

<sup>(\*)</sup> Capítulo formatado de acordo com as normas de publicação da revista *Folia Parasitologica*.

alta variabilidade molecular no sítio de anelamento. Partindo da premissa que o DNA mitocondrial é um importante marcador para subsidiar a delimitação de espécies animais, propõe-se o gene citocromo oxidase II (*coxII*) como um marcador alternativo para estudos de *Gyrodactylus* (e outros gêneros de Gyrodactylidae vivíparos). O sucesso de amplificação de amostras de *Gyrodactylus* com os iniciadores de *coxII* ( $n = 15$ ) foi consideravelmente maior do que com os iniciadores disponíveis de *coxI* ( $n = 3$ ) e resultou em sequências de ótima qualidade (~560 pb). O resultado da análise filogenética de *Gyrodactylus* spp., baseada em sequências de *coxII*, corroborou a prévia identificação morfológica das espécies e apresentou valores de suporte de ramo entre 97–100%. Os resultados revelaram que *coxII* é um potencial marcador molecular para estudos taxonômicos de Gyrodactylidae vivíparos podendo servir, ainda, de uma excelente região do DNA para estudos filogenéticos. O sucesso na amplificação de espécies de outras famílias sugere que os iniciadores de *coxII* podem ser úteis em estudos semelhantes de outros grupos de Monogeneoidea.

**Palavras-chave:** *Gyrodactylus*, *coxII*, código de barras, Monogeneoidea

## **Abstract**

### **Mitochondrial cytochrome oxidase II gene: a potential molecular marker for DNA barcoding of viviparous Gyrodactylidae (Monogeneoidea)**

Gyrodactylidae represents a family of ectoparasites found on freshwater and marine bony fishes worldwide. The identification of these parasites is mainly based on the morphology of haptor sclerites. However, haptor sclerites may show morphological variations in shape and size under different biotic and abiotic conditions, which could cause confusion in the taxonomic delimitation of species. The usage of molecular markers of DNA

has solved part of this issue, especially the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS1–ITS2) and the mitochondrial cytochrome oxidase I gene (*coxI*), which have been useful on the identification of species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832. However, differences in the ITS sequences are highly variable among species of *Gyrodactylus* and it is difficult to establish an unambiguous limit between species based only on ITS. On the other hand, the *coxI* has shown greater accuracy in the delimitation of species and lineages of *Gyrodactylus* because of the accelerated evolutionary rate of mitochondrial DNA. Nevertheless, the *coxI* primers do not work properly for some species of *Gyrodactylus*, apparently due to the interspecific molecular variability. In addition, the amplification of *coxI* could be difficult because it requires the combination of many primers. As mitochondrial DNA is an important molecular marker for DNA barcoding of animal species, this study proposes the cytochrome oxidase II gene (*coxII*) as an alternative marker for studies on *Gyrodactylus* (and other genera of viviparous Gyrodactylidae). The success of DNA amplification of *Gyrodactylus* spp. with *coxII* primers was considerably greater than that performed with *coxI* primers. The amplification of *coxII* resulted in sequences of high quality (~560 bp). The phylogenetic analysis of *Gyrodactylus* spp., based on sequences of *coxII*, confirmed the previous morphological identification of the species and showed branch support values between 97–100%. The results revealed that *coxII* is a potential molecular marker for taxonomic studies of viviparous Gyrodactylidae. Moreover, the *coxII* may also be an excellent marker for phylogenetic and population studies. The successful DNA amplification of species from other families suggests that the primers of *coxII* may be useful in similar studies of other groups of Monogeneoidea.

**Keywords:** *Gyrodactylus*, *coxII*, DNA barcoding, Monogeneoidea

Gyrodactylidae é uma família de ectoparasitos que ocorre principalmente em peixes marinhos e dulcícolas no mundo todo. As espécies ovíparas dessa família são restritas a peixes Siluriformes da América do Sul, enquanto que as espécies vivíparas são amplamente distribuídas e representam um dos táxons mais diversos de Monogeneoidea, com mais de 450 espécies descritas (Boeger et al. 2003, Bakke et al. 2007). A identificação dessas espécies é baseada essencialmente na morfologia de estruturas esclerotizadas do háptor (e.g. âncoras e ganchos). Entretanto, essas estruturas podem apresentar alta variação na forma e tamanho em diferentes condições bióticas e abióticas (Malmberg 1970, Mo 1991a, b, Harris 1998, Geets et al. 1999, Dmitrieva e Dimitrov 2002, Huyse e Volckaert 2002, Dávidová et al. 2005, Bueno-Silva et al. 2011), o que pode causar confusão taxonômica na delimitação das espécies. Parte desse problema tem sido resolvido com a ajuda de marcadores moleculares de DNA, os quais têm sido amplamente usados em estudos de taxonomia, ecologia e filogenia de Gyrodactylidae vivíparos (Harris 1998, Huyse e Volckaert 2002, Cunningham e Mo 1997, Matejusová et al. 2001, Ziętara e Lumme 2002, 2003, Huyse et al. 2003, Meinilä et al. 2004, Hansen et al. 2007).

Algumas espécies de *Gyrodactylus* são altamente virulentas (e.g. *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957) para populações de peixes na natureza e em cativeiro e isso tem estimulado o desenvolvimento de marcadores moleculares que facilitem a distinção entre parasitos patogênicos e não patogênicos (Cunningham et al. 1995a, b, Cunningham e Mo 1997). Embora marcadores moleculares de rDNA nuclear (e.g. espaçador interno transcrito 1 (ITS1)–ITS2) tenham contribuído na diferenciação de espécies de *Gyrodactylus* (Cunningham et al. 1995b, Cunningham 1997), as diferenças interespecíficas altamente variáveis em ITS1–ITS2 (entre 1,5% e 29%) dificultam a delimitação de espécies de *Gyrodactylus* baseada somente nesse marcador molecular (*sensu* Ziętara e Lumme 2002). Por outro lado, marcadores moleculares de DNA mitocondrial (mtDNA), tais como o gene citocromo oxidase I (*coxI*),

tem demonstrado maior precisão na delimitação de espécies e linhagens de *Gyrodactylus* (Huyse e Volckaert 2002, Huyse et al. 2003, Meinilä et al. 2004, Hansen et al. 2007, Bueno-Silva et al. 2011). O mtDNA apresenta um extensivo polimorfismo intraespecífico e, geralmente, evolui mais rápido que o DNA nuclear (Avice 2000), o que torna o gene *coxI* um dos principais marcadores moleculares para estudos filogenéticos de espécies animais (Hebert et al. 2003). Porém, os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam *coxI* não funcionam adequadamente para algumas espécies de *Gyrodactylus*, aparentemente devido à variabilidade molecular interespecífica (Meinilä et al. 2002). Além disso, a amplificação de *coxI* pode se tornar difícil porque requer, na maioria das vezes, a combinação de vários oligonucleotídeos iniciadores em função da alta variabilidade molecular no sítio de anelamento (*sensu* Meinilä et al. 2002, Hansen et al. 2003). Partindo da premissa que o mtDNA é um importante marcador molecular para detectar espécies e linhagens evolutivas de *Gyrodactylus* (Meinilä et al. 2002, 2004, Hansen et al. 2003, 2007, Huyse et al. 2003, Bueno-Silva et al. 2011), o objetivo desse estudo é desenvolver oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene citocromo oxidase II (*coxII*) e avaliar sua utilidade como marcador molecular alternativo para código de barras genético e estudos filogenéticos com Gyrodactylidae vivíparos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os peixes hospedeiros foram coletados em riachos no estado do Paraná (25°22'13"S, 48°25'55"W; 25°50'54"S, 49°43'38"W; 25°29'59"S, 49°02'40"W; 25°36'16"S, 49°07'42"W) e de São Paulo (22°06'10"S, 47°44'36"W), Brasil (Fig. 1). O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) concedeu as licenças para coleta de material biológico (n° 087/2004 e n° 11617/2008). Foram coletadas sete espécies de hospedeiros: *Corydoras paleatus* (Jenyns), *Corydoras ehrhardti* Steindachner, *Gymnotus*

*carapo* Linnaeus, *Hisonotus* sp., *Pareiorhaphis parmula* Pereira, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel) e *Genidens genidens* (Cuvier). Os peixes foram coletados com auxílio de pesca elétrica ou obtidos com pescadores profissionais e, em seguida, acondicionados em recipientes contendo água aquecida (60°C) e agitados vigorosamente, de acordo com a metodologia de Bueno-Silva e Boeger (2009). As amostras foram fixadas com etanol 95% e mantidas a -20°C. Os parasitos foram coletados dessas amostras com auxílio de um estereomicroscópio. O háptor e a região anterior do corpo de cada parasito foram separados do tronco e montados em lâmina com meio de Hoyer para identificação posterior. O tronco foi usado para extração e análise de DNA.

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International) a partir do alinhamento de sequências de *coxII* de Monogenoidea disponíveis no GenBank: *Gyrodactylus derjavinioides* Malmberg, Collins, Cunningham e Jalali, 2007 (nº. de acesso EU293891), *Gyrodactylus thymalli* Žitňan, 1960 (EF527269), *G. salaris* (DQ988931), *Microcotyle sebastis* Goto, 1894 (DQ412044) e *Benedenia seriola* (Yamaguti, 1934) (HM222526.1). Quatro iniciadores, sendo três deles degenerados, foram desenhados dessa maneira: COX2F (5'-TACAYAYCGCCCGTCAAYYTCG-3'), COX2F2 (5'-TTTCACTGAGATAA-GTCGTAAC-3'), COX2R (5'-AATAMWKATWGGCATRWAAGARTG-3') e COX2R2 (5'-TTACCGCTTCCYTGAACACG-3').

Para testar a eficiência desses iniciadores, foram examinadas duas espécies de peixes hospedeiros (Siluriformes: Callichthyidae), as quais são conhecidas por abrigar até quatro espécies de *Gyrodactylus* (Popazoglo e Boeger 2000, Bueno-Silva e Boeger 2009). Esse teste comparou a habilidade de amplificação dos genes *coxI* e *coxII* para as espécies de parasitos amostrados e permitiu avaliar a eficiência dos fragmentos amplificados de *coxII* na discriminação de espécies determinadas morfologicamente.

O DNA total foi extraído com auxílio do kit de extração de tecido DNeasy (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante, com exceção da eluição final que foi realizada com 50 µl. A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de *coxII* continha 3 µl de amostra de DNA (10–30 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Platinum (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR dessa amplificação foram otimizadas da seguinte maneira: 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 42–50°C, 45 s a 72°C e extensão final de 4 min a 72°C. Três combinações de iniciadores (COX2F–COX2R, COX2F2–COX2R2 e COX2F–COX2R2) foram usadas para a amplificação de *coxII*.

As mesmas amostras de DNA amplificadas com os iniciadores de *coxII* foram usadas para amplificar um fragmento do gene *coxI* para fins de comparação (Figs. 2–4). Duas combinações de iniciadores (ZMO1–HB e LB–HB) (Meinilä et al. 2002, Hansen et al. 2003) foram usadas para amplificar um fragmento de *coxI*, pois esses iniciadores já funcionaram com espécies neotropicais de *Gyrodactylus* (Bueno-Silva et al. 2011). A eficiência de amplificação de *coxI* foi testada em soluções de PCR com diferentes concentrações de DNA (15–40 ng), dNTP (0,4–0,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (3–4 mM), Taq polimerase (1–2 U) e iniciadores (0,4–1 pmoles). A solução de PCR que apresentou o melhor resultado de amplificação continha 5 µl de amostra de DNA (~25 ng), 0,5 mM dNTP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Platinum (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,5 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. Essas concentrações de reagentes foram mantidas, portanto, como padrão para as amplificações com *coxI*. As condições da PCR foram otimizadas com base no protocolo de Meinilä et al. (2002): 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C, 2 min a 74°C e finalmente 7 min a 74°C. Os produtos da PCR de *coxI* não foram sequenciados por causa da amplificação de bandas inespecíficas.

Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados com kit MinElute (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com BigDye 3.1 e analisada em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

A análise filogenética baseada no gene *coxII* foi realizada com 18 espécies de sete famílias de Monogenoidea (Tabela 1). Quatro sequências de *coxII* de Monogenoidea disponíveis no GenBank foram usadas nessa análise: *Benedenia hoshinai* Ogawa, 1984 (EF055880.1), *B. seriolae* (HM222526.1), *Neobenedenia* sp. (HM222535.1) e *M. sebastis* (DQ412044.1).

As sequências de DNA foram editadas com os programas Staden Package 1.7 (Bonfield et al. 1995) e BioEdit 7.0.9 (Hall 1999) e alinhadas com o programa MUSCLE 3.7 (Edgar 2004) implementado no portal CIPRES 3.1 (Miller et al. 2009). Uma sequência de *coxII* de *Udonella* sp. foi usada como grupo externo na análise filogenética. A escolha do grupo externo (Udonellidae) foi baseada no relacionamento filogenético de famílias de Monogenoidea (Boeger e Kritsky 2001). O relacionamento filogenético baseado nas sequências de *coxII* foi inferido pelo método de “neighbor-joining” (BIONJ) implementado no programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2001), usando a interface do programa PaupUp (Calendini e Martin 2005). O suporte de ramo foi obtido por “bootstrap” (100.000 repetições). O programa jModelTest 1.1 (Posada 2008) foi usado para selecionar o modelo mais apropriado de evolução molecular (GTR+I+T). As filogenias foram visualizadas e editadas com o programa Dendroscope 2.7.4 (Huson 2007). A divergência nucleotídica entre as espécies foi calculada com base na proporção de sítios variáveis (“p-distance”) usando o programa MEGA 4.1b3 (Tamura et al. 2007).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso de amplificação de amostras de *Gyrodactylus* com os oligonucleotídeos iniciadores de *coxII* ( $n = 15$ ) foi consideravelmente maior do que com os de *coxI* ( $n = 3$ ) (Figs. 2–4). Os iniciadores de *coxI* amplificaram esse fragmento apenas para poucos espécimes ( $n = 3$ ); para a maioria das amostras ( $n = 27$ ), entretanto, não houve amplificação ou a amplificação gerou produtos inespecíficos (veja Figs. 2, 3). Os iniciadores de *coxII* amplificaram em todas as amostras de *Gyrodactylus* (Fig. 4) e resultaram em sequências de ótima qualidade de 564 pb, que foram depositadas no GenBank (GU131195–GU131205). Uma única combinação de iniciadores de *coxII* (COX2F–COX2R) foi suficiente para amplificar e sequenciar as amostras de *Gyrodactylus*. Ocasionalmente, os iniciadores de *coxII* podem falhar na amplificação de DNA, porém isso pode ser resolvido com um ajuste na temperatura de anelamento da PCR.

A análise filogenética das sequências de *coxII* (Fig. 5) revelou o potencial desse fragmento como um importante marcador para código de barras genético de espécies de *Gyrodactylus* e, possivelmente, de outros Monogenoidea, incluindo espécies de Oligonchoinea (Microcotylidae, Bicotylophoridae e Macrovalvitrematidae) e Polyonchoinea (Udonellidae, Capsalidae, Diplectanidae e Gyrodactylidae ovíparos). Todos os clados de espécies de *Gyrodactylus* coincidiram com a prévia identificação morfológica e apresentaram valores de suporte de ramo variando entre 97–100%. A divergência nucleotídica, i.e. a porcentagem de diferenças na composição de nucleotídeos, entre as espécies de Monogenoidea variou entre 11 e 53% (Tabela 2).

O tamanho do fragmento de *coxII* variou entre as espécies de Monogenoidea (426–642 pb). Também houve variação quanto ao códon inicial: todos os *Gyrodactylus* apresentaram códon inicial TTG, enquanto que as outras espécies códon inicial ATG. A maioria das

espécies apresentou códon de parada TAA, com exceção de *M. sebastis* e *B. seriolae*, que possuem códon de parada TAG.

Concluindo, os pares de oligonucleotídeos iniciadores propostos nesse estudo proveram amplificações consistentes dos espécimes de parasitos e o fragmento apresentou grande potencial para reconhecer clados de espécies de *Gyrodactylus*. Além disso, o sucesso de amplificação com os iniciadores de *coxII* foi consideravelmente maior do que com os de *coxI*. Portanto, o gene *coxII* é proposto como um marcador molecular alternativo para código de barras genético de Gyrodactylidae vivíparos. Esse fragmento poderá ser útil em estudos filogenéticos e filogeográficos dessa linhagem de parasitos. A aplicação dos iniciadores de *coxII* pode ainda ser maior do que reconhecido nesse estudo, pois eles foram eficientes na amplificação e sequenciamento de membros de diversas outras famílias de Monogenoidea.

## REFERÊNCIAS

- Avise J.C. 2000: Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, 447 pp.
- Bakke T.A., Cable J., Harris P.D. 2007: The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian Doll-killers”. *Adv. Parasitol.* 64: 161-376.
- Boeger W.A., Kritsky D.C., 2001: Phylogenetic relationships of the Monogenoidea. In: D.T. J. Littlewood e R.A. Bray (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis, London, pp. 92-102.
- Boeger W.A., Kritsky D.C., Pie M.R. 2003: Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogenoidea). *Zool. Scr.* 32: 437-448.
- Bonfield J., Beal K., Cheng Y., Jordan M., Staden R. 1995: Staden Package version 1.7. Disponível em <http://staden.sourceforge.net>.
- Bueno-Silva M., Boeger W.A. 2009: Neotropical Monogenoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. *Folia Parasitol.* 56: 13-20.
- Bueno-Silva M., Boeger W.A., Pie M.R. 2011: Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogenoidea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.* 41: 657-667.
- Calendini F., Martin J.F. 2005: PaupUP v1.0.3.1. A free graphical frontend for PAUP Dos software. Disponível em <http://www.agromontpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main.htm>.
- Cunningham C. 1997: Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.* 83: 215–219.

- Cunningham C.O., McGilliwray D.M., MacKenzie K., Melvin W.T. 1995: Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavini* and *G. truttae* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology* 111: 87–94.
- Cunningham C.O., McGilliwray D.M., MacKenzie K., Melvin W.T. 1995: Identification of *Gyrodactylus* (Monogenea) species parasitising salmonid fish using DNA probes. *J. Fish Dis.* 18: 539–544.
- Cunningham C.O., Mo T.A. 1997: Random amplified polymorphic (RAPD) analysis of three Norwegian *Gyrodactylus salaris* populations (Monogenea; Gyrodactylidae). *J. Parasitol.* 83: 311–314.
- Dávidová M., Jarkovský J., Matějusková I., Gelnar M. 2005: Seasonal occurrence and metrical variability of *Gyrodactylus rhodei* Žitňan 1964 (Monogenea, Gyrodactylidae). *Parasitol. Res.* 95: 398–405.
- Dmitrieva E., Dimitrov G. 2002: Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 51: 199–206.
- Edgar R.C. 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792–1797.
- Geets A., Appleby C., Ollevier F. 1999: Host-dependent and seasonal variation in opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus* cf. *arcuatus* from three *Pomatoschistus* spp. and *G. arcuatus* from *Gasterosteus aculeatus*: a multivariate approach. *Parasitology* 119: 27–40.
- Hall T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.

- Hansen H., Bachmann L., Bakke T.A. 2003: Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.* 33: 1471-1478.
- Hansen H., Bakke T.A., Bachmann L. 2007: Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.* 100: 1389-1394.
- Harris P.D. 1998: Extreme morphological variation between related individuals of *Gyrodactylus pungitti* Malmberg, 1964 (Monogenea). *Syst. Parasitol.* 39: 137-140.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R. 2003: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 270: S96-S99.
- Huson D.H., Richter D.C., Rausch C., Dezulian T., Franz M., Rupp R. 2007: Dendroscope - An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8: 460.
- Huyse T., Audenaert V., Volckaert F.A.M. 2003: Speciation and host-parasite relationships in the genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). *Int. J. Parasitol.* 33: 1679-1689.
- Huyse T., Volckaert F.A.M. 2002: Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 32: 907-919.
- Malmberg G. 1970: The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematic of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool.* 23: 1-235.
- Matejusová I., Gelnar M., McBeath A.J.A., Collins C.M., Cunningham C.O. 2001: Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *Int. J. Parasitol.* 31: 738-745.

- Meinilä M., Kuusela J., Ziętara M., Lumme J. 2002: Primers for amplifying ~ 820 bp highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas* 137: 72-74.
- Meinilä M., Kuusela J., Ziętara M.S., Lumme J. 2004: Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.* 34: 515-526.
- Miller M.A., Holder M.T., Vos R., Midford P.E., Liebowitz T., Chan L., Hoover P., Warnow T. 2009: The CIPRES Portals. Disponível em <http://www.phylo.org>.
- Mo T.A. 1991a: Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol.* 20: 11-19.
- Mo T.A. 1991b: Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. *Syst. Parasitol.* 20: 1-9.
- Park J.K., Kim K.H., Kang S., Kim W., Eom K.S., Littlewood D.T. 2007: A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evol. Biol.* 7: 11.
- Perkins E.M., Donnellan S.C., Bertozzi T., Whittington I.D. 2010: Closing the mitochondrial circle on paraphyly of the Monogenea (Platyhelminthes) infers evolution in the diet of parasitic flatworms. *Int. J. Parasitol.* 40: 1237-1245.
- Popazoglo F., Boeger W.A. 2000: Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of southern Brazil. *Folia Parasitol.* 47: 105-110.

- Posada D. 2008: jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.
- Swofford D.L. 2001: PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and others methods). Version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Ziętara M.S., Lumme J. 2002: Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution* 56: 2445-2458.
- Ziętara M.S., Lumme J. 2003: The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Syst. Parasitol.* 55: 39-52.

## Legenda das Figuras

**Figura 1.** Imagem de satélite do estado do Paraná e estado de São Paulo, mostrando a área de estudo. Os números correspondem aos locais de coleta: ponto (1) (25°22'13"S, 48°25'55"W), município de Paranaguá; ponto (2) (25°50'54"S, 49°43'38"W), município de Lapa; ponto (3) (25°29'59"S, 49°02'40"W) e ponto (4) (25°36'16"S, 49°07'42"W), município de Curitiba; ponto (5) (22°06'10"S, 47°44'36"W), município de São Carlos. Fonte do mapa: Google Maps (<http://maps.google.com.br>).

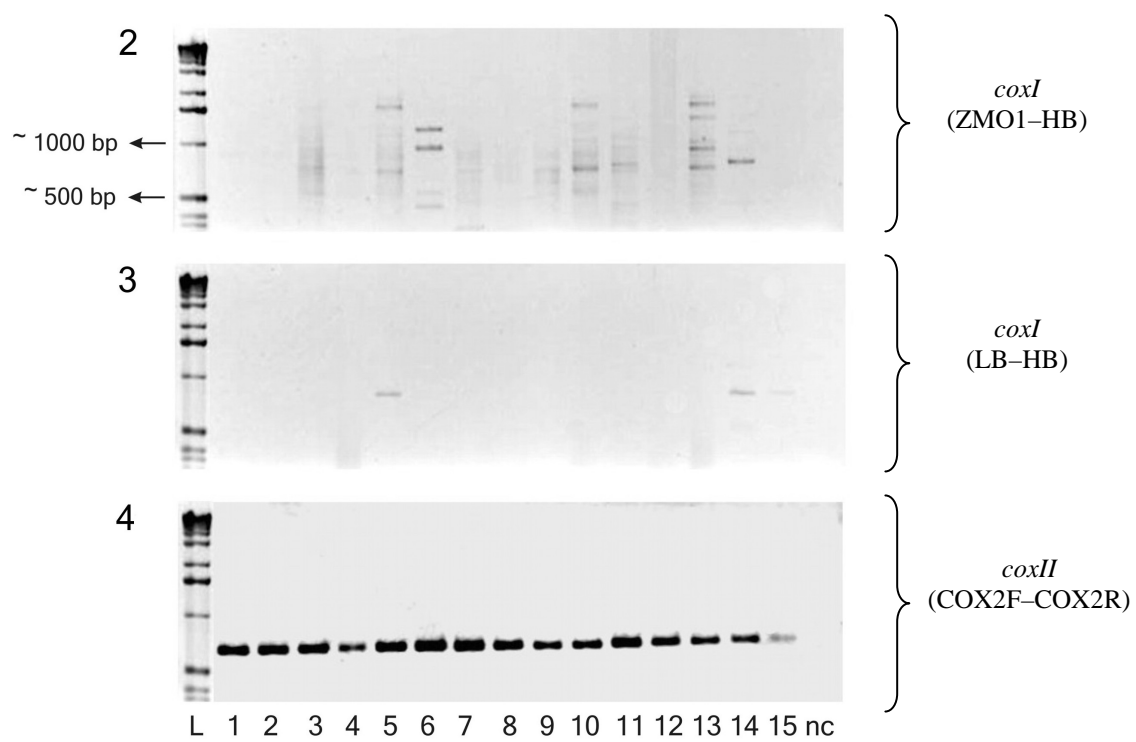
**Figs. 2–4.** Produtos de PCR obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores de *coxI* e *coxII* para espécimes de *Gyrodactylus*. **Fig. 2.** Amostras amplificadas com o par de iniciadores ZMO1–HB (gene *coxI*). **Fig. 3.** Amostras amplificadas com o par de iniciadores LB–HB (gene *coxI*). **Fig. 4.** Amostras amplificadas com o par de iniciadores COX2F–COX2R (gene *coxII*). L = “ladder” (marcador para estimar tamanho do fragmento de DNA); 1 = *Gyrodactylus samirae* Popazoglo e Boeger, 2000 (GU131200); 2–10 = *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva e Boeger, 2009 (GU131195-GU131199); 11–15 = *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) (GU131201-GU131205); cn = controle negativo.

**Fig. 5.** Dendograma da análise de “neighbor-joining” das sequências de *coxII* de 18 espécies de sete famílias de Monogenoidea. *Udonella* sp. foi usada como grupo externo. São apresentados valores de suporte de ramo acima de 50%.

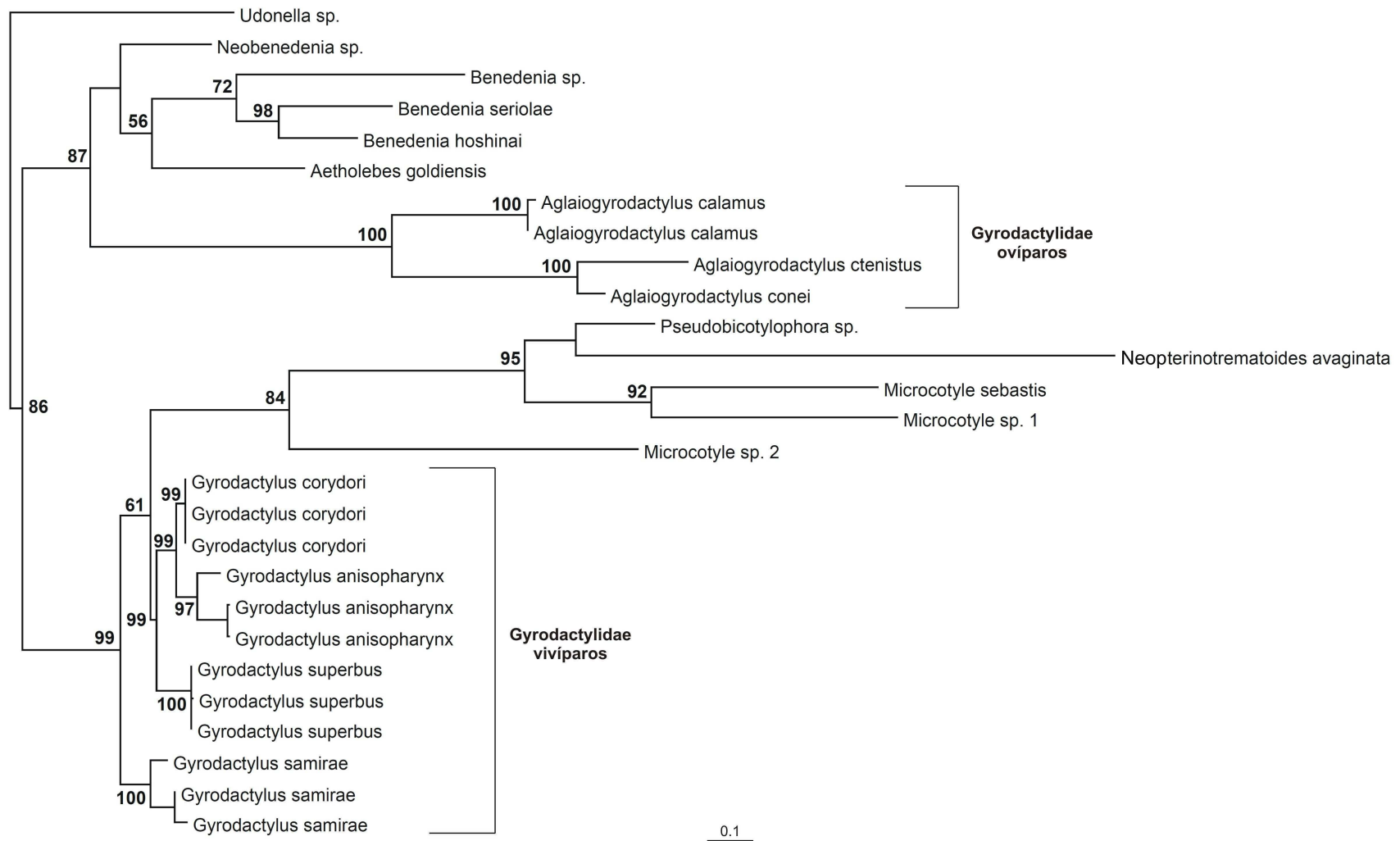




**Figura 1**



**Figs. 2–4**



**Figura 5**

**Tabela 1.** Lista de espécies usadas na inferência filogenética de Monogenoidea com base no gene mitocondrial citocromo oxidase II (*coxII*).

Espécie	Família
<i>Udonella</i> sp.	Udonellidae
<i>Neobenedenia</i> sp. <sup>(1)</sup>	
<i>Benedenia</i> sp.	Capsalidae
<i>Benedenia seriolae</i> (Yamaguti, 1934) <sup>(2)</sup>	
<i>Benedenia hoshinai</i> Ogawa, 1984 <sup>(3)</sup>	
<i>Aetholebes goldiensis</i>	Diplectanidae
<i>Aglaiogyrodactylus calamus</i> Kritsky, Vianna e Boeger, 2007	
<i>Aglaiogyrodactylus ctenistus</i> Kritsky, Vianna e Boeger, 2007	
<i>Aglaiogyrodactylus coneis</i> Kritsky, Vianna e Boeger, 2007	
<i>Gyrodactylus corydori</i> Bueno-Silva e Boeger, 2009	Gyrodactylidae
<i>Gyrodactylus anisopharynx</i> Popazoglo e Boeger, 2000	
<i>Gyrodactylus superbis</i> (Szidat, 1973)	
<i>Gyrodactylus samirae</i> Popazoglo e Boeger, 2000	
<i>Pseudobicotylophora</i> sp.	Bicotylophoridae
<i>Neopteriotrematoides avaginata</i> Suriano, 1975	Macrovalvitrematidae
<i>Microcotyle sebastis</i> Goto, 1894 <sup>(4)</sup>	
<i>Microcotyle</i> sp. 1	Microcotylidae
<i>Microcotyle</i> sp. 2	

<sup>(1)</sup> e <sup>(2)</sup> Sequências do GenBank (HM222535.1; HM222526.1) de Perkins et al. (2010);

<sup>(3)</sup> Sequência do GenBank não publicada (EF055880.1);

<sup>(4)</sup> Sequência do GenBank (DQ412044.1) de Park et al. (2007);

**Tabela 2.** Divergência nucleotídica entre espécies de Monogenoidea com base no gene mitocondrial citocromo oxidase II (*coxII*) (em proporção de sítios variáveis).

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>Udonella</i> sp.	-																
2 <i>Pseudobicotylophora</i> sp.	0,34	-															
3 <i>Microcotyle</i> sp. 1	0,39	0,37	-														
4 <i>Microcotyle</i> sp. 2	0,50	0,48	0,49	-													
5 <i>Microcotyle sebastis</i>	0,43	0,35	0,41	0,43	-												
6 <i>Pterinotrematoides avaginata</i>	0,39	0,39	0,49	0,49	0,45	-											
7 <i>Aetholebes goldiensis</i>	0,26	0,44	0,47	0,43	0,47	0,41	-										
8 <i>Benedenia hoshinai</i>	0,36	0,41	0,51	0,48	0,50	0,43	0,28	-									
9 <i>Benedenia seriola</i>	0,34	0,43	0,51	0,45	0,47	0,42	0,32	0,20	-								
10 <i>Benedenia</i> sp.	0,36	0,45	0,49	0,49	0,53	0,46	0,31	0,27	0,29	-							
11 <i>Neobenedenia</i> sp.	0,34	0,41	0,45	0,45	0,45	0,41	0,26	0,30	0,34	0,26	-						
12 <i>Aglaiogyrodactylus calamus</i>	0,39	0,42	0,49	0,49	0,52	0,48	0,42	0,40	0,36	0,37	0,38	-					
13 <i>Aglaiogyrodactylus cone</i>	0,34	0,42	0,49	0,47	0,48	0,44	0,37	0,35	0,33	0,38	0,37	0,31	-				
14 <i>Aglaiogyrodactylus ctenistus</i>	0,36	0,41	0,49	0,49	0,50	0,49	0,35	0,37	0,36	0,40	0,38	0,31	0,16	-			
15 <i>Gyrodactylus samirae</i>	0,28	0,33	0,45	0,45	0,39	0,36	0,30	0,32	0,33	0,35	0,30	0,37	0,35	0,39	-		
16 <i>Gyrodactylus superbus</i>	0,30	0,35	0,41	0,39	0,43	0,41	0,31	0,32	0,39	0,33	0,32	0,42	0,36	0,41	0,18	-	
17 <i>Gyrodactylus anisopharynx</i>	0,30	0,34	0,41	0,39	0,41	0,39	0,30	0,31	0,31	0,34	0,31	0,41	0,36	0,40	0,14	0,16	-
18 <i>Gyrodactylus corydori</i>	0,30	0,34	0,41	0,39	0,39	0,36	0,30	0,28	0,30	0,32	0,30	0,38	0,31	0,35	0,14	0,14	0,11

## CAPÍTULO II

### **Quatro espécies novas de *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) de *Scleromystax* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) do sul do Brasil <sup>(\*)</sup>**

Título abreviado: Quatro espécies novas de *Gyrodactylus* de Siluriformes

#### **Resumo**

Quatro novas espécies de *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 são descritas da superfície corporal de duas espécies de Siluriformes (Callichthyidae) do sul do Brasil. Os peixes hospedeiros foram coletados em rios das sub-bacias da baía de Paranaguá e do rio Nhundiaquara, litoral do estado do Paraná, Brasil. Foram coletados 313 espécimes de *Gyrodactylus* em duas espécies hospedeiras, *Scleromystax macropterus* (Regan) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard). Foram usados dois conjuntos de técnicas, morfométricas e moleculares, para subsidiar a proposta das novas espécies parasitas. Nove distâncias morfométricas de âncora e gancho foram avaliadas por análise discriminante e MANOVA. A análise morfométrica revelou diferenças significativas ( $P < 0,001$ ) em oito medidas, as quais permitiram reconhecer quatro espécies novas de *Gyrodactylus* com 100% de precisão. Essas espécies podem ser distinguidas de outras de *Gyrodactylus* neotropicais com base na morfologia de âncoras e ganchos. *Gyrodactylus* sp. n. 1 distingue-se de outras espécies pelo gancho (com lâmina e ponta ligeiramente curvada; lâmina com porção proximal reta; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico pontiagudo, com porção inferior suavemente deprimida) e âncora (com raiz superficial robusta). *Gyrodactylus* sp. n. 2

---

<sup>(\*)</sup> Capítulo formatado de acordo com as normas de publicação da revista *Folia Parasitologica*.

distingue-se pelo gancho (com lâmina ligeiramente curvada; calcanhar reto; plataforma reta; bico pontiagudo, com porção inferior reta) e âncora (com raiz superficial alongada). *Gyrodactylus* sp. n. 3 distingue-se pelo gancho (com lâmina e ponta ligeiramente curvada; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico pontiagudo, com porção inferior reta) e âncora (com raiz superficial curvada na porção distal). *Gyrodactylus* sp. n. 4 distingue-se pelo gancho (com lâmina e ponta ligeiramente curvada; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico convexo, com porção inferior suavemente deprimida) e âncora (com raiz superficial curta; raiz profunda bastante desenvolvida). A análise de “neighbor-joining” dos fragmentos de *coxII* (mtDNA) e ITS1–ITS2 (rDNA nuclear) corroborou a identidade das novas espécies de *Gyrodactylus*.

**Palavras-chave:** *Gyrodactylus*, morfometria, *Scleromystax*, taxonomia, *coxII*, ITS

## **Abstract**

### **Four new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) of *Scleromystax* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil**

Four new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 are described from the body surface of two species of Siluriformes (Callichthyidae) from southern Brazil. Fish hosts were collected from coastal rivers of the Bay of Paranaguá, State of Paraná, Brazil. A total of 313 specimens of *Gyrodactylus* were found in two host species, *Scleromystax macropterus* (Regan) and *Scleromystax barbatus* (Quoy and Gaimard). We used two sets of morphological and molecular techniques to support the proposal of new species of *Gyrodactylus*. Nine morphometric features of the anchors and hooks were measured and analysed by discriminant analysis and MANOVA. The morphometric analysis revealed significant differences ( $P <$

0.001) in eight measurements, which allowed us to recognize four new species of *Gyrodactylus* with 100% accuracy. These species could be distinguished from other Neotropical species of *Gyrodactylus* by the morphology of anchors and hooks. *Gyrodactylus* sp. n. 1 can be distinguished from other species by morphology of the hook (with shaft and point recurved; proximal shaft straight; heel convex; shelf convex; toe concave, pointed, depressed), and anchor (with superficial root robust). *Gyrodactylus* sp. n. 2 can be distinguished by the hook (with shaft recurved; heel straight; shelf straight; toe pointed), and anchor (with superficial root elongate). *Gyrodactylus* sp. n. 3 can be distinguished by the hook (with shaft and point recurved; heel convex; shelf convex; toe pointed), and anchor (with distal superficial root recurved). *Gyrodactylus* sp. n. 4 can be distinguished by the hook (with shaft and point recurved; heel convex; shelf convex; toe convex, depressed), and anchor (with superficial root short; deep root very developed). The neighbor-joining analysis of sequences of *coxII* (mtDNA) and ITS1–ITS2 (nuclear rDNA) confirmed the identity of the new species of *Gyrodactylus*.

**Keywords:** *Gyrodactylus*, morphometry, *Scleromystax*, taxonomy, *coxII*, ITS



Os Monogenoidea representam um diverso grupo de parasitos de peixes, amplamente distribuído no mundo. Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863 inclui todas as espécies vivíparas conhecidas dessa classe. Nessa família, *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 é o gênero com maior número de espécies conhecidas, das quais algumas são consideradas uma séria ameaça à manutenção de populações de peixes na natureza e em cativeiro (McVicar 1997, Boeger et al. 2003, Bakke et al. 2007).

Na Região Neotropical são conhecidas cerca de 40 espécies de Gyrodactylidae, das quais, aproximadamente, 20 são de *Gyrodactylus* (Boeger et al. 2006, Kritsky et al. 2007, Cohen e Kohn 2008). Nesse capítulo, quatro novas espécies neotropicais de *Gyrodactylus* são descritas para duas espécies simpátricas de peixes Siluriformes (Callichthyidae) da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil: *Scleromystax macropterus* (Regan) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes adultos de *S. macropterus* e *S. barbatus* foram coletados em rios das sub-bacias da baía de Paranaguá e do rio Nhundiaquara (Fig. 1), litoral do estado do Paraná, Brasil (licença do IBAMA nº. 11617/2008). *Scleromystax macropterus* foi coletado na sub-bacia da baía de Paranaguá ( $n = 34$ ), no rio Fortuna (25°39'54"S, 48°31'05"W), município de Pontal do Paraná. *Scleromystax barbatus* foi coletado na sub-bacia da baía de Paranaguá ( $n = 63$ ), no rio Ribeirão (25°36'02"S, 48°37'19"W), município de Paranaguá, e no rio Fortuna (25°39'54"S, 48°31'05"W), em Pontal do Paraná; e na sub-bacia do rio Nhundiaquara ( $n = 44$ ), no rio do Pinto (25°30'50"S, 48°50'34"W) e no rio Marumbi (25°30'54"S, 48°52'03"W), município de Morretes. O método de coleta dos parasitos foi o mesmo de Bueno-Silva e Boeger (2009): os peixes hospedeiros foram coletados com auxílio de pesca elétrica e puçá, e

em seguida foram acondicionados em recipientes contendo água aquecida a 60°C e agitados vigorosamente. As amostras foram fixadas em etanol 95% (para análise molecular) ou formalina 5% (para análise morfológica). As amostras fixadas em etanol foram armazenadas a -20°C. Dois conjuntos de técnicas moleculares e morfométricas foram usados para confirmar a identificação das espécies de *Gyrodactylus*. O háptor de cada parasito foi separado do tronco e montado em lâmina com meio de Hoyer, para identificação morfológica. O tronco foi usado para extração de DNA.

O estudo molecular foi conduzido com dois marcadores de DNA: um de mtDNA (*coxII*) e um de rDNA nuclear (ITS1–ITS2). O DNA total foi extraído com auxílio do kit de extração de tecido DNeasy (Qiagen). A amplificação do gene *coxII* foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores propostos por Bueno-Silva (capítulo I): COX2F (5'-TACAYAYCGC-CCGTCAAYYTCG-3') e COX2R (5'-AATAMWKATWGG-CATRWAAGARTG-3'). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene *coxII* continha 3 µl de amostra de DNA (10–30 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Platinum (Invitrogen), PCR–buffer (1X), 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 42–50°C, 45 s a 72°C e extensão final de 4 min a 72°C.

A amplificação de ITS1–ITS2 foi realizada com os iniciadores de Ziętara et al. (2000): ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3') e ITS2 (5'-GGTAATCA-CGCTTGAATC-3'). A PCR para amplificação de ITS continha 3 µl de amostra de DNA, 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Platinum (Invitrogen), PCR–buffer (1X), 0,5 pmoles de cada iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 95°C, 45 s a 50°C, 1 min a 72°C e extensão final de 5 min a 72°C.

Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados com kit MinElute (Qiagen). A reação de sequenciamento foi realizada com BigDye 3.1 e analisada em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

As sequências de DNA foram editadas com os programas Staden Package 1.7 (Bonfield et al. 1995) e BioEdit 7.0.9 (Hall 1999) e alinhadas com o programa MUSCLE 3.7 (Edgar 2004) implementado no portal CIPRES 3.1 (Miller et al. 2009). Uma sequência de *coxII* de *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva e Boeger, 2009 e uma sequência de ITS1–ITS2 de *Gyrodactylus anisopharynx* Popazoglo e Boeger, 2000 foram usadas como grupo externo nas análises filogenéticas. A aproximação do relacionamento filogenético dos indivíduos, baseado nas sequências de *coxII* e ITS, foi inferida pelo método de “neighbor-joining” (BIONJ) implementado no programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2001), usando a interface do programa PaupUp (Calendini e Martin 2005). O suporte de ramo foi obtido pelo método de “bootstrap” (100.000 repetições). O programa jModelTest 1.1 (Posada 2008) foi usado para selecionar o modelo mais apropriado de evolução molecular (TPM2uf+I para *coxII*; TVM+I para ITS1–ITS2). As árvores filogenéticas foram visualizadas e editadas com o programa Dendroscope 2.7.4 (Huson 2007). A divergência nucleotídica de *coxII* e ITS1–ITS2 foi calculada com o programa MEGA 4.1b3 (Tamura et al. 2007).

O estudo morfológico dos parasitos foi conduzido com espécimes montados em lâminas com meio de Hoyer, para estudo das partes esclerotizadas, e em bálsamo do Canadá, após coloração com tricrômico de Gomori, para estudo das partes moles do corpo (Humason 1979). O estudo morfométrico foi conduzido com organismos clarificados em meio de Hoyer, os quais foram fotografados com uma câmera digital (Olympus QColor 5) acoplada a um microscópio óptico com contraste de fase (Olympus BX 51).

As distâncias morfométricas foram definidas seguindo os parâmetros usados por Bueno-Silva e Boeger (2009): medidas com alta correlação entre si, baixo coeficiente de variação

(menor que 20%) e ausência de redundância geométrica. Dessa forma, foram escolhidas nove distâncias morfométricas (Figs. 2, 3) de estruturas esclerotizadas do háptor (i.e. âncora e gancho): abertura da ponta da âncora (APA), largura da lâmina da âncora (LLA), ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA), comprimento da curva interna da âncora (CCIA), comprimento total da âncora (CTA), comprimento da haste do gancho (CHG), comprimento da cabeça do gancho (CCG), abertura da ponta do gancho (APG) e largura distal do gancho (LDG). As medidas e escalas são apresentadas em micrômetros, com exceção da medida AAPA que é apresentada em graus.

As distâncias entre pontos morfométricos foram obtidas com o programa SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Inc.). Os dados foram logaritmizados (logaritmo natural) para corrigir a variância das medidas (Shinn et al. 1996). As distâncias resultantes foram avaliadas por análise de componentes principais (PCA), análise discriminante e análise de variância multivariada (MANOVA) com auxílio do programa Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). A PCA foi calculada a partir da matriz de correlação das variáveis.

## RESULTADOS

A morfologia comparativa de âncoras e ganchos permitiu o reconhecimento de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* coletadas em duas espécies hospedeiras (*S. macropterus* e *S. barbatus*): *Gyrodactylus* sp. n. 1 ( $n = 90$ ), *Gyrodactylus* sp. n. 2 ( $n = 122$ ), *Gyrodactylus* sp. n. 3 ( $n = 94$ ) e *Gyrodactylus* sp. n. 4 ( $n = 7$ ). O baixo número amostral de *Gyrodactylus* sp. n. 4 parece indicar que essa espécie é rara.

As médias de todas as distâncias morfométricas são apresentadas na Tabela 1. O resultado da PCA mostrou os dois primeiros fatores com autovalores acima da média, sendo que esses fatores representaram 73% da variação morfométrica de âncora e gancho das

espécies novas de *Gyrodactylus* (Tabela 2). O primeiro fator mostrou cinco variáveis com escores maiores que 0,7 (APA, LLA, CTA, CCG e APG) e o segundo fator duas variáveis (AAPA e CCIA) (Tabela 3).

O resultado da MANOVA revelou diferenças significativas nas distâncias morfométricas de âncora e gancho entre as espécies de *Gyrodactylus* (Wilks' lambda = 0,0005;  $F = 128,4$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 113$ ). A análise discriminante também revelou diferenças significativas entre as espécies em oito medidas morfométricas de âncora e gancho (Tabela 4): comprimento total da âncora (CTA) ( $F = 1253,7$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento da haste do gancho (CHG) ( $F = 520,5$ ;  $P < 0,001$ ), abertura da ponta da âncora (APA) ( $F = 368,3$ ;  $P < 0,001$ ), abertura da ponta do gancho (APG) ( $F = 292,4$ ;  $P < 0,001$ ), largura da lâmina da âncora (LLA) ( $F = 232,7$ ;  $P < 0,001$ ), ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA) ( $F = 190,4$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento da cabeça do gancho (CCG) ( $F = 161,5$ ;  $P < 0,001$ ) e largura distal do gancho (LDG) ( $F = 146,3$ ;  $P < 0,001$ ). O resultado da análise discriminante confirmou a identificação prévia das espécies de *Gyrodactylus* com base na morfologia de âncoras e ganchos e permitiu a correta discriminação das espécies em 100% dos casos (Fig. 4).

A análise de “neighbor-joining” dos fragmentos de ITS1–ITS2 e *coxII* revelou duas topologias congruentes (Fig. 5). Todos os clados de espécies de *Gyrodactylus* coincidiram com a prévia identificação morfológica e apresentaram valores de suporte de ramo de 99–100% para *coxII* e de 100% para ITS. A divergência nucleotídica entre as espécies (Tabela 5) variou de 15 a 26% para *coxII* e de 3 a 31% para ITS. A menor divergência nucleotídica com base em ITS (3%) foi observada entre as espécies *Gyrodactylus* sp. n. 2 e *Gyrodactylus* sp. n. 3.

A análise morfológica comparativa e o conjunto de dados morfométricos e moleculares permitiram o reconhecimento de quatro novas espécies neotropicais de *Gyrodactylus*, que são descritas abaixo.

## DESCRIÇÃO

**Gyrodactylidae** van Beneden et Hesse, 1863

***Gyrodactylus*** von Nordmann, 1832

*Gyrodactylus* sp. n. 1 (Figs. 6–10)

**Descrição** (baseada em 48 espécimes). Corpo alongado, 519 (413–688;  $n = 27$ ) de comprimento, 90 (53–122;  $n = 27$ ) de largura ao nível do embrião. Glândulas cefálicas, órgãos da cabeça conspícuos. Glândulas cefálicas anterior, lateral, posteriormente à faringe. Faringe distal 37 (22–43;  $n = 14$ ) de largura, com projeções digitiformes; faringe proximal 42 (31–49;  $n = 14$ ) de largura. Testículo oval 26 (18–37;  $n = 6$ ) de largura, posterior ao germário. Órgão copulatório masculino 17 (15–21;  $n = 13$ ) de diâmetro, um bulbo armado com 1 espinho grande, duas fileiras de espineletes: uma fileira externa com 5–7 espineletes com base robusta, outra fileira interna com 4–6 menores de base estreita. Germário oval, 27 (18–40;  $n = 20$ ) de comprimento, 35 (19–53;  $n = 20$ ) de largura. Útero com até duas gerações de embriões. Âncora com raiz profunda desenvolvida e raiz superficial robusta; comprimento da ponta da âncora 21 (19–23;  $n = 20$ ), largura da lâmina 8 (6–8;  $n = 20$ ), comprimento total 54 (51–56;  $n = 20$ ). Gancho com lâmina e ponta ligeiramente curvada, lâmina com porção proximal reta, calcanhar convexo, plataforma convexa, bico pontiagudo, com porção inferior suavemente deprimida; haste com 20 (19–21;  $n = 20$ ) de comprimento, cabeça do gancho com 9 (8–10;  $n$

= 20) de comprimento. Barra profunda 4 (3–5;  $n = 24$ ) de largura. Barra superficial 9 (7–12;  $n = 12$ ) de largura, com projeções anterolaterais, provida de escudo membranoso.

**Hospedeiro tipo:** *Scleromystax macropterus* (Regan) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Outro hospedeiro:** *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Local de infestação no hospedeiro:** superfície do corpo.

**Localidade tipo:** rio Fortuna, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil (25°39'54"S, 48°31'05"W).

**Comentários.** *Gyrodactylus* sp. n. 1 pode ser distinguida de outras espécies neotropicais de *Gyrodactylus* com base na morfologia do gancho (lâmina e ponta ligeiramente curvada; lâmina com porção proximal reta; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico pontiagudo, com porção inferior suavemente deprimida) e da âncora (raiz superficial robusta).

*Gyrodactylus* sp. n. 2 (Figs. 11–15)

**Descrição** (baseada em 56 espécimes). Corpo alongado, 360 (284–453;  $n = 30$ ) de comprimento, 68 (40–97;  $n = 30$ ) de largura ao nível do embrião. Glândulas cefálicas, órgãos da cabeça conspícuos. Glândulas cefálicas anterior, lateral, posteriormente à faringe. Faringe distal 34 (21–43;  $n = 24$ ) de largura, faringe proximal 37 (23–51;  $n = 25$ ) de largura. Testículo oval 24 (15–32;  $n = 5$ ) de largura, posterior ao germário. Órgão copulatório masculino 14 (11–16;  $n = 22$ ) de diâmetro, um bulbo armado com 1 espinho grande, duas fileiras de espineletes: uma fileira externa com 3–4 espineletes com base robusta, outra fileira interna com 2–3 menores de base estreita. Germário oval, 25 (15–33;  $n = 20$ ) de comprimento, 30 (18–47;  $n = 20$ ) de largura. Útero com até duas gerações de embriões. Âncora com raiz profunda desenvolvida e raiz superficial alongada, ligeiramente curvada; comprimento da

ponta da âncora 17 (16–18;  $n = 23$ ), largura da lâmina 7 (6–8;  $n = 23$ ), comprimento total 55 (50–57;  $n = 23$ ). Gancho com lâmina ligeiramente curvada, calcanhar reto, plataforma reta, bico pontiagudo, com porção inferior reta; haste com 17 (15–20;  $n = 20$ ) de comprimento, cabeça do gancho com 9 (9–10;  $n = 20$ ) de comprimento. Barra profunda 3 (2–3;  $n = 24$ ) de largura. Barra superficial 10 (6–14;  $n = 16$ ) de largura, com projeções anterolaterais, provida de escudo membranoso.

**Hospedeiro tipo:** *Scleromystax macropterus* (Regan) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Outro hospedeiro:** *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Local de infestação no hospedeiro:** superfície do corpo.

**Localidade tipo:** rio Fortuna, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil (25°39'54"S, 48°31'05"W).

**Comentários.** *Gyrodactylus* sp. n. 2 pode ser distinguida de outras espécies neotropicais de *Gyrodactylus* com base na morfologia do gancho (lâmina ligeiramente curvada; calcanhar reto; plataforma reta; bico pontiagudo, com porção inferior reta) e da âncora (raiz superficial alongada; lâmina comparativamente mais estreita).

*Gyrodactylus* sp. n. 3 (Figs. 16–20)

**Descrição** (baseada em 25 espécimes). Corpo alongado, 370 (321–412;  $n = 7$ ) de comprimento, 80 (45–132;  $n = 7$ ) de largura ao nível do embrião. Glândulas cefálicas, órgãos da cabeça conspicuos. Glândulas cefálicas anterior, lateral, posteriormente à faringe. Faringe distal 40 (33–49;  $n = 4$ ) de largura, faringe proximal 41 (35–53;  $n = 4$ ) de largura. Testículo oval 20 (13–18;  $n = 2$ ) de largura, posterior ao germário. Órgão copulatório masculino 15 (14–18;  $n = 8$ ) de diâmetro, um bulbo armado com 1 espinho grande, duas fileiras de



espineletes: uma fileira externa com 5–7 espineletes com base robusta, outra fileira interna com 4–7 menores de base estreita. Germário oval, 25 (21–31;  $n = 6$ ) de comprimento, 35 (21–50;  $n = 6$ ) de largura. Útero com até duas gerações de embriões. Âncora com raiz profunda desenvolvida e raiz superficial moderadamente curvada na porção distal; comprimento da ponta da âncora 19 (16–20;  $n = 20$ ), largura da lâmina 7 (6–8;  $n = 20$ ), comprimento total 49 (46–53;  $n = 20$ ). Gancho com lâmina e ponta ligeiramente curvada, calcanhar convexo, plataforma convexa, bico pontiagudo, com porção inferior reta; haste com 15 (13–16;  $n = 21$ ) de comprimento, cabeça do gancho com 9 (8–10;  $n = 21$ ) de comprimento. Barra profunda 3 (2–4;  $n = 9$ ) de largura. Barra superficial 12 (8–14;  $n = 9$ ) de largura, com projeções anterolaterais, provida de escudo membranoso.

**Hospedeiro tipo:** *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Outro hospedeiro:** *Scleromystax macropterus* (Regan) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Local de infestação no hospedeiro:** superfície do corpo.

**Localidade tipo:** rio Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil (25°30'54"S, 48°52'03"W).

**Outras localidades:** rio do Pinto, Morretes, Paraná, Brasil (25°30'50"S, 48°50'34"W); rio Fortuna, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil (25°39'54"S, 48°31'05"W); rio Ribeirão, Paranaguá, Paraná, Brasil (25°36'02"S, 48°37'19"W).

**Comentários.** *Gyrodactylus* sp. n. 3 pode ser distinguida de outras espécies neotropicais de *Gyrodactylus* com base na morfologia do gancho (lâmina e ponta ligeiramente curvada; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico pontiagudo, com porção inferior reta) e da âncora (raiz superficial com porção distal recurvada).

**Descrição** (baseada em 7 espécimes). Corpo fusiforme, 239 (145–302;  $n = 4$ ) de comprimento, 58 (48–68;  $n = 4$ ) de largura ao nível do embrião. Glândulas cefálicas, órgãos da cabeça conspicuos. Glândulas cefálicas anterior, lateral, posteriormente à faringe. Faringe distal 25 (19–29;  $n = 3$ ) de largura, faringe proximal 31 (24–35;  $n = 3$ ) de largura. Testículo oval 31 ( $n = 1$ ) de largura, posterior ao germário. Órgão copulatório masculino não observado. Germário oval, 23 (16–27;  $n = 4$ ) de comprimento, 26 (17–36;  $n = 4$ ) de largura. Útero com uma geração de embrião. Âncora com raiz profunda muito desenvolvida e raiz superficial curta; comprimento da ponta da âncora 11 (10–12;  $n = 6$ ), largura da lâmina 5 (4–5;  $n = 6$ ), comprimento total 27 (25–28;  $n = 7$ ). Gancho com lâmina e ponta ligeiramente curvada, calcanhar convexo, plataforma convexa, bico convexo, com porção inferior suavemente deprimida; haste com 15 (15–16;  $n = 7$ ) de comprimento, cabeça do gancho com 6 (6–7;  $n = 7$ ) de comprimento. Barra profunda 1 (1–1;  $n = 3$ ) de largura. Barra superficial 5 (4–7;  $n = 2$ ) de largura, com projeções anterolaterais, provida de escudo membranoso.

**Hospedeiro tipo:** *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard) (Siluriformes, Callichthyidae).

**Local de infestação no hospedeiro:** superfície do corpo.

**Localidade tipo:** rio Ribeirão, Paranaguá, Paraná, Brasil (25°36'02"S, 48°37'19"W).

**Outras localidades:** rio do Pinto, Morretes, Paraná, Brasil (25°30'50"S, 48°50'34"W); rio Marumbi, Morretes, Paraná, Brasil (25°30'54"S, 48°52'03"W).

**Comentários.** *Gyrodactylus* sp. n. 4 pode ser distinguida de outras espécies neotropicais de *Gyrodactylus* com base na morfologia do gancho (lâmina e ponta ligeiramente curvada; calcanhar convexo; plataforma convexa; bico convexo, com porção inferior suavemente

deprimida) e da âncora (raiz profunda muito desenvolvida; raiz superficial curta). Além disso, constatou-se que as âncoras e ganchos de *Gyrodactylus* sp. n. 4 são comparativamente menores que aquelas de *Gyrodactylus* sp. n. 1, *Gyrodactylus* sp. n. 2 e *Gyrodactylus* sp. n. 3 (ver Figs. 25–32).

## DISCUSSÃO

As diferenças morfológicas de estruturas esclerotizadas do háptor permitiram reconhecer quatro espécies novas de *Gyrodactylus* em peixes hospedeiros *Scleromystax*. A análise morfométrica suportou a identidade das espécies parasitas, como também evidenciado por outros autores para outras espécies do gênero (Shinn et al. 1996, 2004, McHugh et al. 2000, Huyse e Volckaert 2002, Bueno-Silva e Boeger 2009). Embora as âncoras tenham apresentado maior variação morfométrica, a morfologia dos ganchos foi mais informativa na discriminação e caracterização das espécies novas de *Gyrodactylus*.

Da mesma forma, os marcadores moleculares de mtDNA e rDNA nuclear confirmaram os resultados das análises morfológica e morfométrica, demonstrando a sua utilidade como suporte na delimitação de espécies de *Gyrodactylus* (Cunningham 1997, Ziętara et al. 2000, Huyse e Volckaert 2002, Ziętara e Lumme 2002, Hansen et al. 2003, Bueno-Silva capítulo I). As análises filogenéticas moleculares de *coxII* e ITS1–ITS2 permitiram reconhecer clados de espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax* spp. que coincidiram com a prévia identificação morfológica e morfométrica dos parasitos.

A baixa divergência nucleotídica de ITS (3%) entre *Gyrodactylus* sp. n. 2 e *Gyrodactylus* sp. n. 3 pode indicar uma separação recente dessas espécies (menor do que 1 milhão de anos – Ma), segundo a taxa evolutiva de ITS (5,5% por Ma) estimada por Ziętara e Lumme (2002). Por outro lado, a divergência nucleotídica de ITS entre as demais espécies foi

consideravelmente maior (29–31%) e comparável a de espécies de *Gyrodactylus* do hemisfério norte (Ziğtara e Lumme 2002). Apesar da baixa divergência nucleotídica de ITS entre *Gyrodactylus* sp. n. 2 e *Gyrodactylus* sp. n. 3, não foi possível sustentar, satisfatoriamente, a hipótese de que esses táxons representam uma única espécie, considerando a divergência nucleotídica de *coxII* (veja Tabela 5) e as diferenças morfológicas interespecíficas de estruturas esclerotizadas do háptor (veja Fig. 4). No entanto, a análise comparativa da estrutura secundária de ITS2 e o uso de um marcador molecular alternativo de DNA nuclear (e.g. íntron) serão necessários para confirmar essa hipótese (veja capítulo III).

Concluindo, o uso integrado de técnicas morfométricas e moleculares permitiu o reconhecimento de quatro novas espécies neotropicais de *Gyrodactylus* parasitando duas espécies simpátricas de *Scleromystax* (*S. barbatus* e *S. macropterus*) no sul do Brasil. Essas espécies de *Gyrodactylus* são as primeiras a serem descritas para esse gênero de peixe hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

- Bakke T.A., Cable J., Harris P.D. 2007: The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian doll-killers”. *Adv. Parasitol.* 64: 161-376.
- Boeger W.A., Kritsky D.C., Pie M.R. 2003: Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea). *Zool. Scr.* 32: 437-448.
- Boeger W.A., Vianna R.T., Thatcher, V.E. 2006: Monogeneoidea. In: J. Adis, J.R. Arias, G. Rueda-Delgado and K.M. Wantzen (Eds.), *Aquatic Biodiversity in Latin America*. Vol. 1. Amazon Fish Parasites. Second edition. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria, pp. 42-116.
- Bonfield J, Beal K, Cheng Y, Jordan M, Staden R. 1995: Staden Package version 1.7. Disponível em <http://staden.sourceforge.net>.
- Bueno-Silva M., Boeger W.A. 2009: Neotropical Monogeneoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidae: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. *Folia Parasitol* 56: 13-20.
- Calendini F., Martin J.F. 2005: PaupUP v1.0.3.1. A free graphical frontend for PAUP Dos software. Disponível em <http://www.agromontpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/main.htm>.
- Cohen S.C., Kohn A. 2008: South American Monogenea – list of species, hosts and geographical distribution from 1997 to 2008. *Zootaxa* 1924: 1-42.
- Cunningham C. 1997: Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.* 83: 215–219.
- Edgar R.C. 2004: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.

- Hall T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symp. Ser. 41: 95-98.
- Hansen H., Bachmann L., Bakke T.A. 2003: Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. Int. J. Parasitol. 33: 1471-1478.
- Humason G.L. 1979: Animal Tissue Techniques. 4th ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 661 p.
- Huson D.H., Richter D.C., Rausch C., DeZulian T., Franz M., Rupp R. 2007: Dendroscope - An interactive viewer for large phylogenetic trees. BMC Bioinformatics 8: 460.
- Huyse T., Volckaert F.A.M. 2002: Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with description of *Gyrodactylus rugiensoides* n. sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). Int. J. Parasitol. 32: 907-919.
- Kritsky D.C., Vianna R.T., Boeger W.A. 2007: Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with proposal of *Phanerothecioides* n. gen., *Onychogyrodactylus* n. gen. and *Aglaiogyrodactylus* n. gen. (Polyonchoinea, Gyrodactylidea). Syst. Parasitol. 66: 1-34.
- McHugh E.S., Shinn A.P., Kay J.W. 2000: Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. Parasitology 121: 315-323.
- McVicar A.H. 1997: Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. J. Mar. Sci. 54: 1093-1103.
- Miller M.A., Holder M.T., Vos R., Midford P.E., Liebowitz T., Chan L., Hoover P., Warnow T. 2009: The CIPRES Portals. Disponível em <http://www.phylo.org>.
- Posada D. 2008: jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25: 1253-1256.

- Shinn A.P., des Clers S., Gibson D.I., Sommerville C. 1996: Multivariate analyses of morphometrical features from *Gyrodactylus* spp. (Monogenea) parasitising British salmonids: light microscope based studies. *Syst. Parasitol.* 33: 115-125.
- Shinn A.P., Hansen H., Olstad K., Bachmann L., Bakke T.A. 2004: The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.* 51: 239-252.
- Swofford D.L. 2001: PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and others methods). Version 4.0b10, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Ziętara M.S., Arndt A., Geets A., Hellemans B., Volckaert F.A.M., 2000: The nuclear rDNA region of *Gyrodactylus arcuatus* and *G. branchicus* (Monogenea: Gyrodactylidae). *J. Parasitol.* 86: 1368-1373.
- Ziętara M.S., Lumme J. 2002: Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution* 56: 2445-2458.

## Legenda das Figuras

**Fig. 1.** Imagem de satélite da baía de Paranaguá, estado do Paraná, mostrando a área de estudo. Os números correspondem aos locais de coleta: (1) rio Marumbi, município de Morretes; (2) rio do Pinto, município de Morretes; (3) rio Ribeirão, município de Paranaguá; (4) rio Fortuna, município de Pontal do Paraná. Fonte do mapa: Google Maps (<http://maps.google.com.br>).

**Figs. 2, 3.** Distâncias morfométricas de estruturas esclerotizadas do háptor de *Gyrodactylus*.

**Fig. 2.** Âncora. APA: abertura da ponta da âncora; LLA: largura da lâmina da âncora; AAPA ( $\beta$ ): ângulo de abertura da ponta da âncora; CCIA: comprimento da curva interna da âncora; CTA: comprimento total da âncora. **Fig. 3.** Gancho. CHG: comprimento da haste do gancho; CCG: comprimento da cabeça do gancho; APG: abertura da ponta do gancho; LDG: largura distal do gancho. Escalas: Fig. 2 = 30  $\mu\text{m}$ ; Fig. 3 = 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 4.** Análise discriminante de medidas de âncora e gancho de *Gyrodactylus* sp. n. 1, *Gyrodactylus* sp. n. 2, *Gyrodactylus* sp. n. 3 e *Gyrodactylus* sp. n. 4, parasitas de *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*. Nove distâncias morfométricas de âncora e gancho foram analisadas: abertura da ponta da âncora (APA), largura da lâmina da âncora (LLA), ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA), comprimento da curva interna da âncora (CCIA), comprimento total da âncora (CTA), comprimento da haste do gancho (CHG), comprimento da cabeça do gancho (CCG), abertura da ponta do gancho (APG) e largura distal do gancho (LDG). As elipses representam intervalo de confiança de 95%.



**Fig. 5.** Dendogramas da análise de “neighbor-joining” das sequências de *coxII* (à esquerda) e ITS1–ITS2 (à direita) de *Gyrodactylus* sp. n. 1, *Gyrodactylus* sp. n. 2, *Gyrodactylus* sp. n. 3 e *Gyrodactylus* sp. n. 4, parasitas de *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*. Os valores representam suporte de ramo.

**Figs. 6–10.** *Gyrodactylus* sp. n. 1. **Fig. 6.** Holótipo (ventral). **Fig. 7.** Âncoras, barra superficial e barra profunda. **Fig. 8.** Gancho. **Fig. 9.** Órgão copulatório masculino. **Fig. 10.** Âncora. Escala: Fig. 6 = 100 µm; Figs. 7, 10 = 20 µm; Figs. 8, 9 = 10 µm.

**Figs. 11–15.** *Gyrodactylus* sp. n. 2. **Fig. 11.** Holótipo (ventral). **Fig. 12.** Âncoras, barra superficial e barra profunda. **Fig. 13.** Gancho. **Fig. 14.** Órgão copulatório masculino. **Fig. 15.** Âncora. Escala: Fig. 11 = 100 µm; Figs. 12, 15 = 20 µm; Figs. 13, 14 = 10 µm.

**Figs. 16–20.** *Gyrodactylus* sp. n. 3. **Fig. 16.** Holótipo (ventral). **Fig. 17.** Âncoras, barra superficial e barra profunda. **Fig. 18.** Gancho. **Fig. 19.** Órgão copulatório masculino. **Fig. 20.** Âncora. Escala: Fig. 16 = 100 µm; Figs. 17, 20 = 20 µm; Figs. 18, 19 = 10 µm.

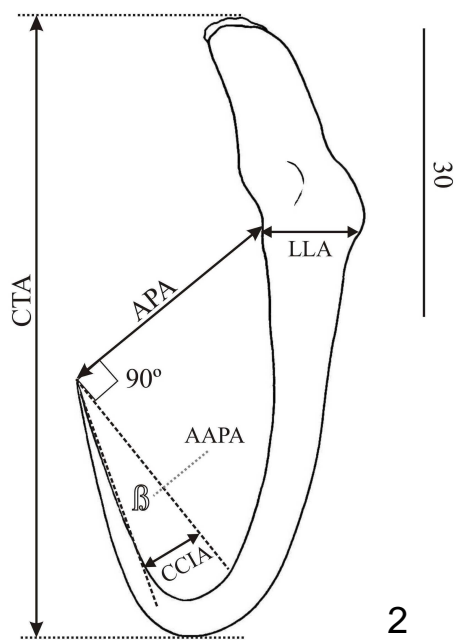
**Figs. 21–24.** *Gyrodactylus* sp. n. 4. **Fig. 21.** Holótipo (ventral). **Fig. 22.** Âncoras, barra superficial e barra profunda. **Fig. 23.** Gancho. **Fig. 24.** Âncora. Escala: Fig. 21 = 100 µm; Figs. 22, 24 = 10 µm; Fig. 23 = 5 µm.

**Figs. 25–32.** Imagens de microscopia óptica de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* coletadas em *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. **Fig. 25.** Âncora de *Gyrodactylus* sp. n. 1. **Fig. 26.** Gancho de *Gyrodactylus* sp. n. 1. **Fig. 27.** Âncora de *Gyrodactylus* sp. n. 2. **Fig. 28.** Gancho de *Gyrodactylus* sp. n. 2. **Fig. 29.** Âncora de

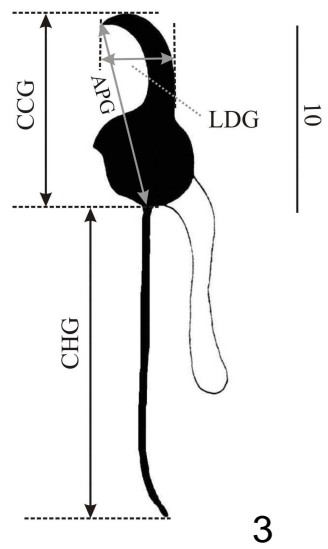
*Gyrodactylus* sp. n. 3. **Fig. 30.** Gancho de *Gyrodactylus* sp. n. 3. **Fig. 31.** Âncora de *Gyrodactylus* sp. n. 4. **Fig. 32.** Gancho de *Gyrodactylus* sp. n. 4. Escalas: Figs. 25, 27, 29, 31 = 20  $\mu\text{m}$ ; Figs. 26, 28, 30, 32 = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 1**

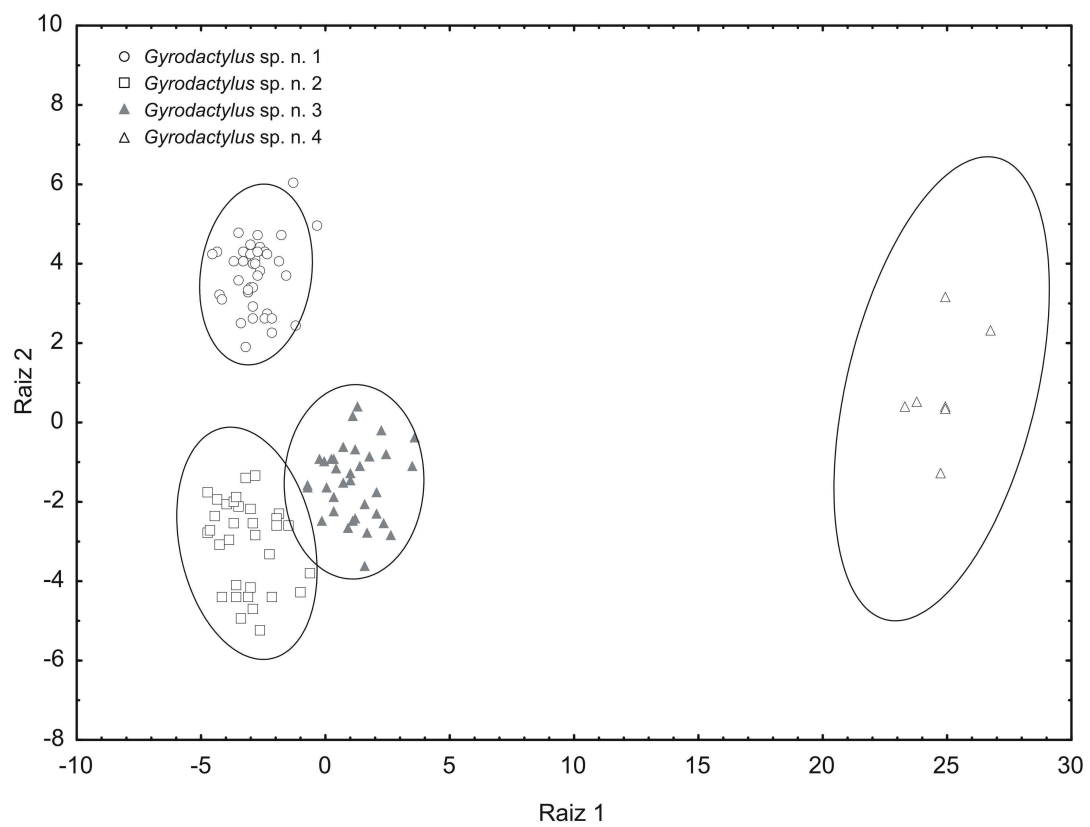


2

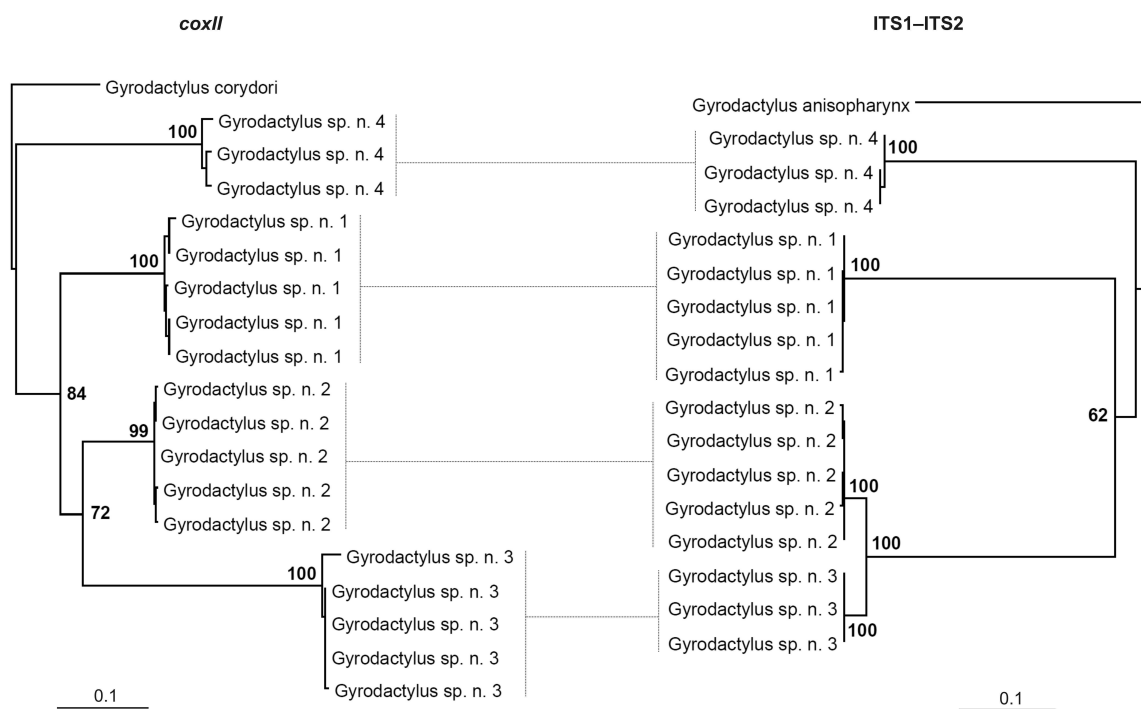


3

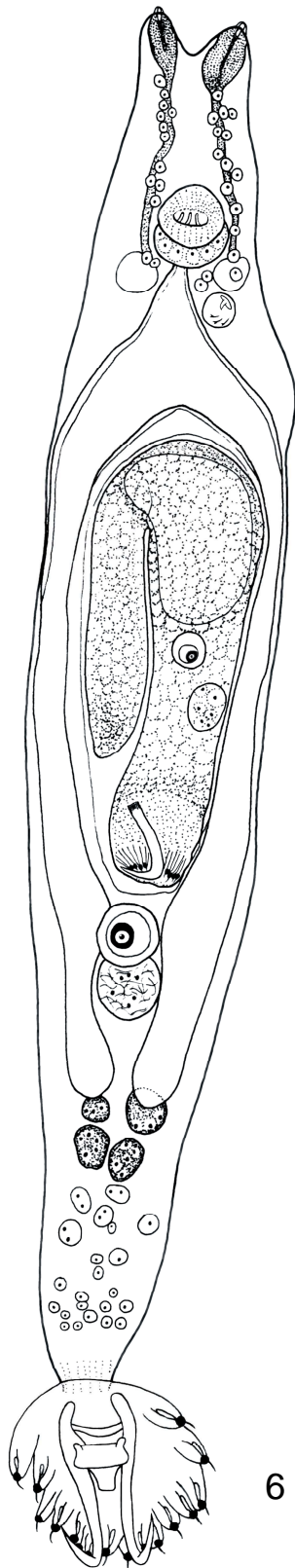
**Figs. 2, 3**



**Figura 4**

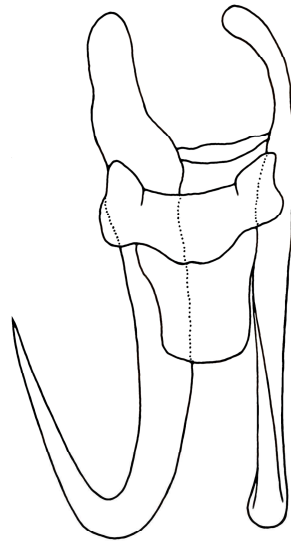


**Figura 5**



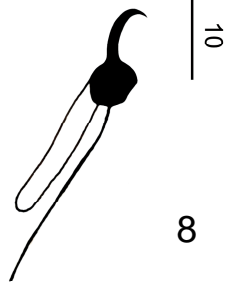
6

100



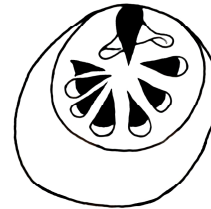
7

20



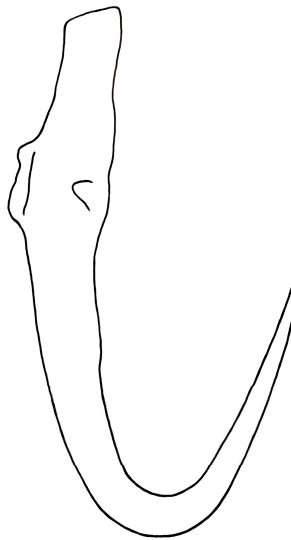
8

10



9

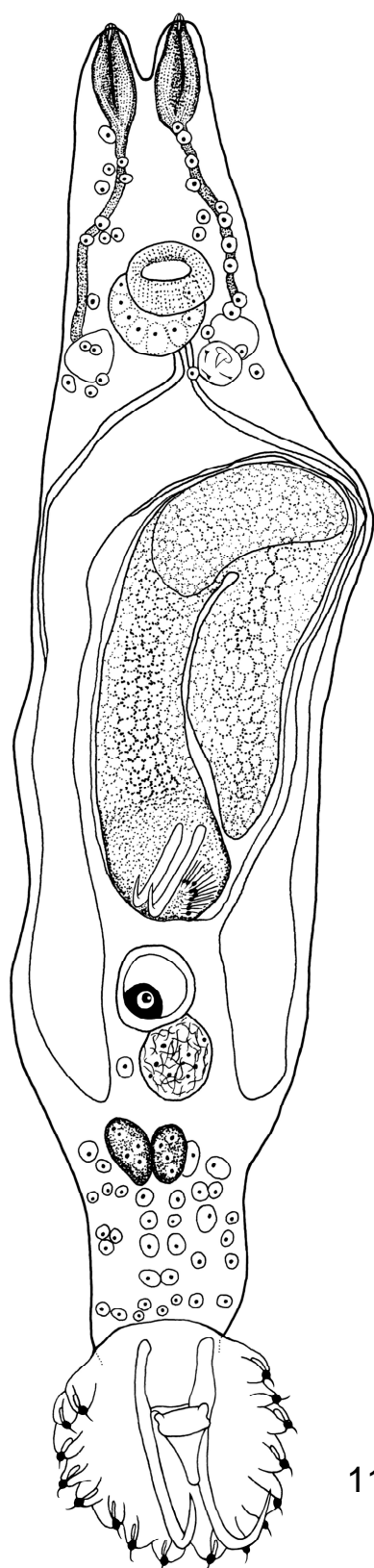
10



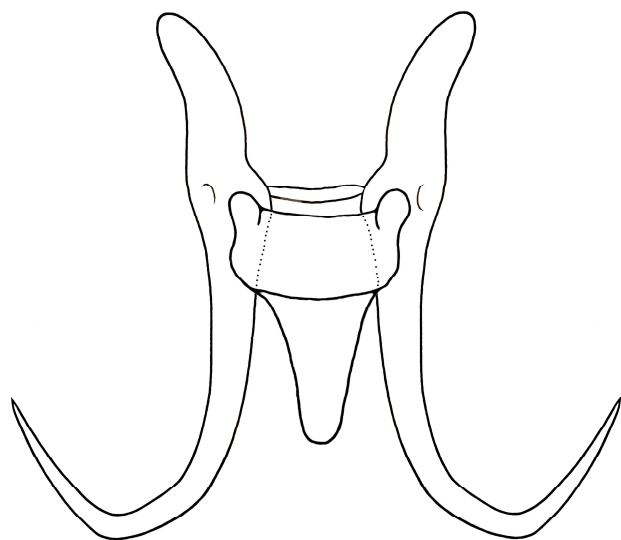
10

20

**Figs. 6–10**



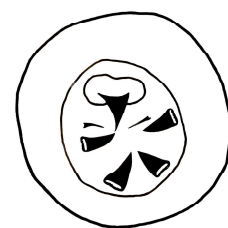
11



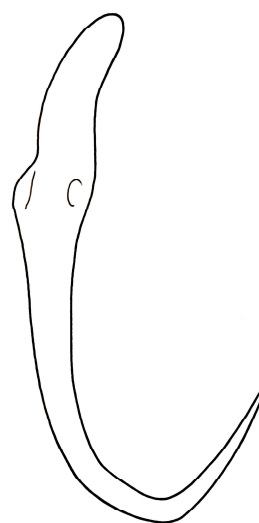
12



13



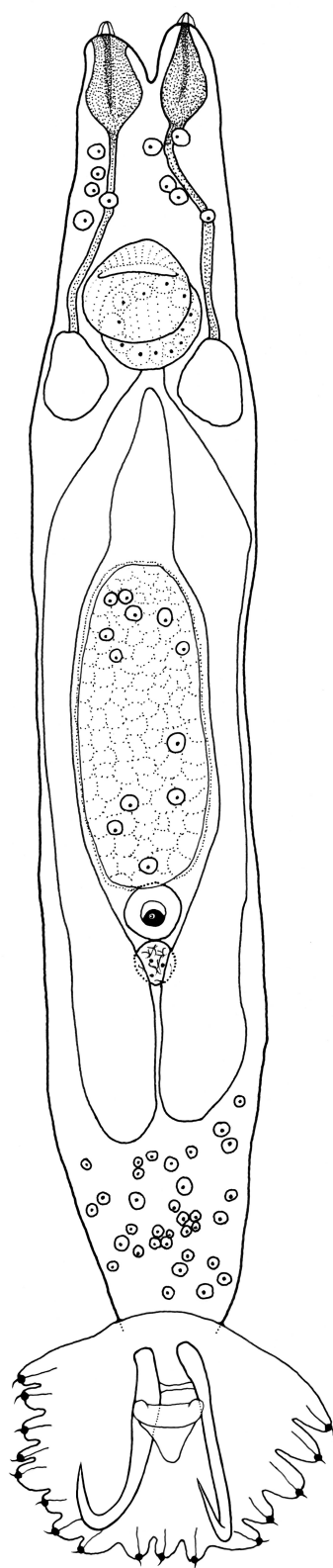
14



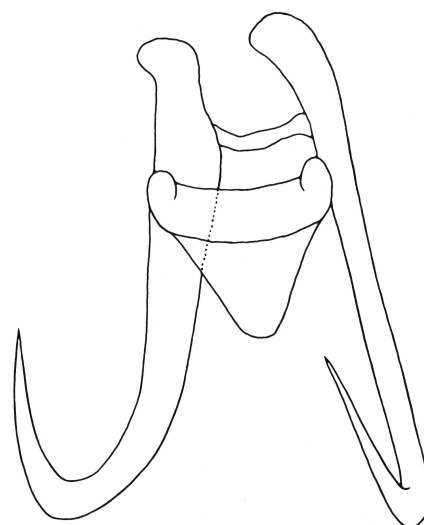
15

Figs. 11–15





16



17



18

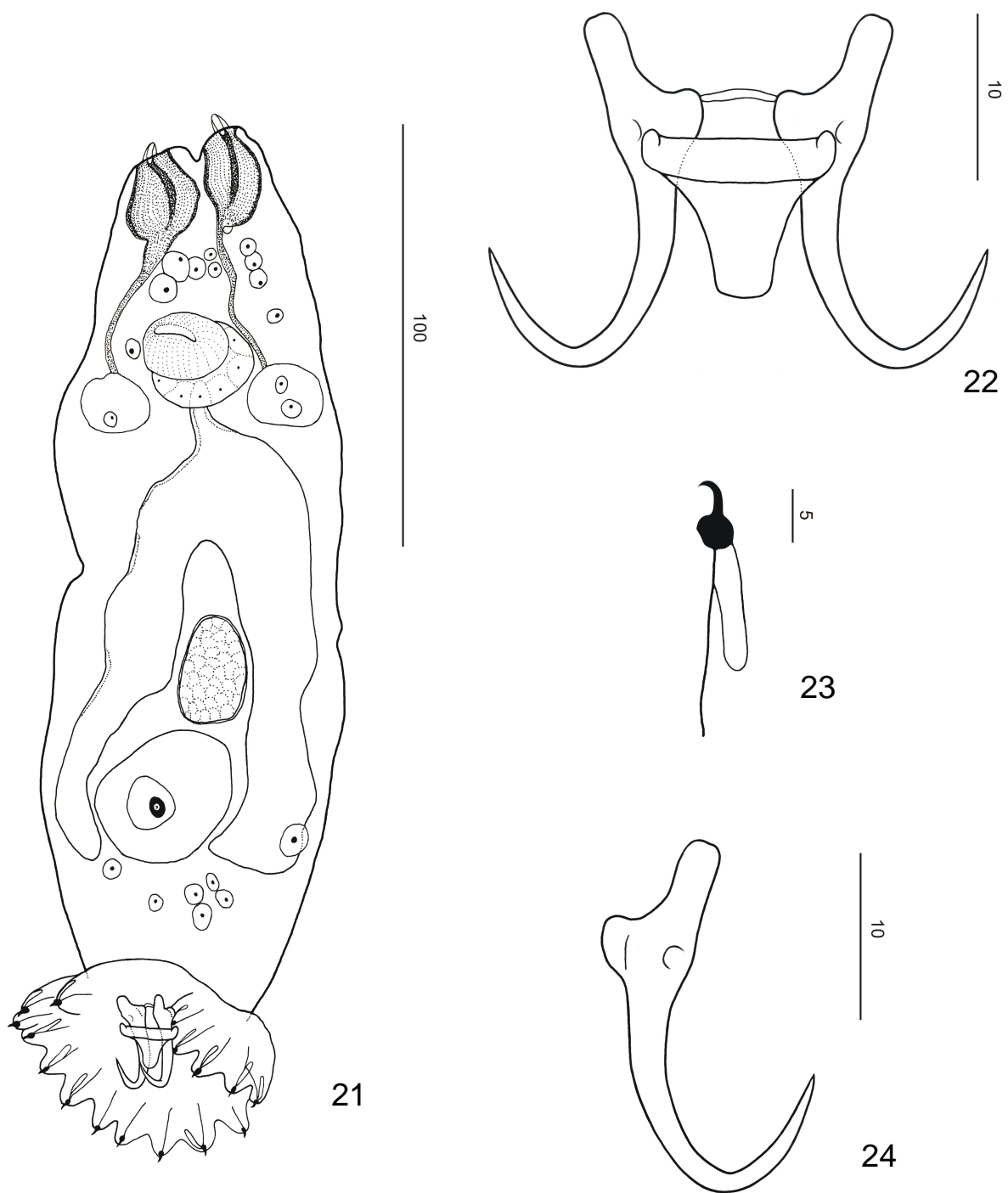


19

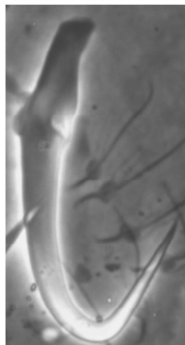


20

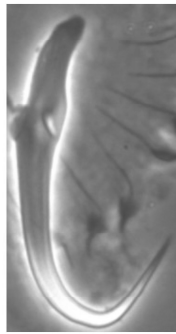
**Figs. 16–20**



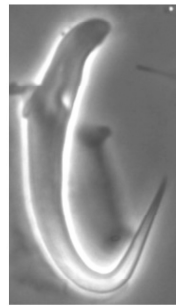
**Figs. 21–24**



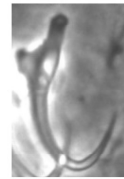
25



27

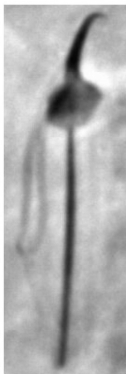


29



31

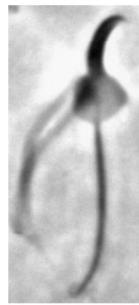
20



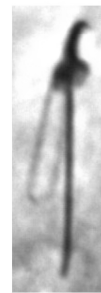
26



28



30



32

10

**Figs. 25–32**

**Tabela 1.** Valores médios das distâncias morfométricas de âncora e gancho de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* coletadas em *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. As medidas são apresentadas em micrômetros, com exceção da variável ângulo de abertura da ponta da âncora, apresentada em graus. Os números indicam, respectivamente, a média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses).

		<i>Gyrodactylus</i>	<i>Gyrodactylus</i>	<i>Gyrodactylus</i>	<i>Gyrodactylus</i>
Variáveis		sp. n. 1	sp. n. 2	sp. n. 3	sp. n. 4
		(n = 39)	(n = 33)	(n = 34)	(n = 7)
Âncora	Abertura da ponta	20,9 (20,5-21,3)	26,0 (25,7-26,4)	19,9 (19,4-20,5)	11,0 (9,4-12,7)
	Largura da lâmina	7,9 (7,7-8,1)	7,6 (7,3-7,8)	7,7 (7,5-7,9)	4,6 (4,0-5,3)
	Comprimento da curva interna	2,0 (1,7-2,2)	1,9 (1,6-2,2)	1,7 (1,3-2,1)	0,9 (0,2-1,6)
	Ângulo de abertura da ponta	5,7 (4,9-6,5)	7,6 (6,2-8,9)	5,8 (4,5-7,0)	6,3 (1,5-11,1)
	Comprimento total	54,1 (53,6-54,6)	55,1 (54,6-55,7)	49,0 (48,5-49,5)	26,6 (25,5-27,8)
Gancho	Comprimento da haste	20,1 (19,8-20,4)	16,0 (15,6-16,4)	15,1 (14,9-15,4)	15,5 (14,8-16,1)
	Comprimento do gancho	9,5 (9,4-9,7)	9,3 (9,2-9,4)	9,2 (9,1-9,4)	6,3 (6,0-6,5)
	Largura distal	3,1 (2,9-3,3)	3,0 (2,8-3,1)	3,2 (3,1-3,4)	2,3 (2,0-2,6)
	Abertura da ponta	9,5 (9,4-9,5)	9,2 (9,1-9,3)	9,1 (9,0-9,2)	5,8 (5,6-6,1)

**Tabela 2.** Autovalores da matriz de correlação da PCA de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*.

Fator	Autovalores	% Variação total	Autovalor cumulativo	% Cumulativa
1	4,75	52,8	4,75	52,8
2	1,84	20,4	6,59	73,2
3	0,97	10,8	7,56	84,0
4	0,87	9,6	8,43	93,6
5	0,29	3,3	8,72	96,9
6	0,13	1,5	8,86	98,4
7	0,10	1,1	8,95	99,5
8	0,03	0,4	8,98	99,8
9	0,02	0,2	9,00	100,0

**Tabela 3.** Escores da PCA de âncoras e ganchos de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*.

Variáveis	Fator 1	Fator 2
Abertura da ponta da âncora (APA)	-0,85	-0,02
Largura da lâmina da âncora (LLA)	-0,91	-0,21
Ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA)	0,00	0,96
Comprimento da curva interna da âncora (CCIA)	-0,28	0,92
Comprimento total da âncora (CTA)	-0,97	0,07
Comprimento da haste do gancho (CHG)	-0,34	0,10
Comprimento da cabeça do gancho (CCG)	-0,94	-0,07
Abertura da ponta do gancho (APG)	-0,97	-0,05
Largura distal do gancho (LDG)	-0,48	-0,06

**Tabela 4.** Análise discriminante das distâncias morfométricas de âncora e gancho de quatro espécies novas de *Gyrodactylus* de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. (Wilks' lambda = 0,0006;  $F = 146,3$ ;  $P < 0,001$ ;  $n = 113$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' lambda	Tolerância	Valor de $F$	Índice $P$
Comprimento total da âncora (CTA)	1	0,0017	0,52	1253,7	< 0,001
Comprimento da haste do gancho (CHG)	2	0,0030	0,93	520,5	< 0,001
Abertura da ponta da âncora (APA)	3	0,0015	0,55	368,3	< 0,001
Abertura da ponta do gancho (APG)	4	0,0008	0,28	292,4	< 0,001
Largura da lâmina da âncora (LLA)	5	0,0007	0,58	232,7	< 0,001
Ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA)	6	0,0007	0,65	190,4	< 0,001
Comprimento da cabeça do gancho (CCG)	7	0,0007	0,21	161,5	< 0,001
Largura distal do gancho (LDG)	8	0,0007	0,47	146,3	< 0,001

**Tabela 5.** Divergência nucleotídica (em proporção de sítios variáveis) entre quatro espécies novas de *Gyrodactylus* de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. Valores sublinhados representam a divergência nucleotídica de *coxII*. Valores na parte superior (à direita) representam a divergência nucleotídica de ITS1–ITS2.

Espécie	1	2	3	4
1 <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 1	-	0,29	0,29	0,29
2 <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 2	<u>0,15</u>	-	0,03	0,31
3 <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3	<u>0,22</u>	<u>0,20</u>	-	0,31
4 <i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4	<u>0,20</u>	<u>0,21</u>	<u>0,26</u>	-



## CAPÍTULO III

### **Cofilogeografia: avaliando a estruturação geográfica, demografia histórica e associação entre espécies de *Gyrodactylus* (Monogenoidea: Gyrodactylidae) e hospedeiros *Scleromystax* (Siluriformes: Callichthyidae) no sul do Brasil <sup>(\*)</sup>**

#### **Resumo**

A filogeografia comparativa é um importante método usado para investigar a influência de fenômenos geográficos e geológicos na diversificação e adaptação local de sistemas parasito-hospedeiro. Partindo dessa premissa, o estudo objetivou avaliar a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversificação morfológica e associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. em sub-bacias litorâneas do estado do Paraná, Brasil. Espécimes adultos de *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) ( $n = 34$ ) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard, 1824) ( $n = 107$ ) foram coletados em rios das sub-bacias da baía de Paranaguá e do rio Nhundiaquara. Foram coletados 313 espécimes de quatro espécies novas de *Gyrodactylus*. Nove distâncias morfométricas de parasitos e de hospedeiros foram analisadas. A análise desses dados revelou diferenças morfométricas significativas entre populações de hospedeiros ( $P < 0,001$ ) e de parasitos ( $P < 0,001$ ) entre diferentes rios e sub-bacias. Fragmentos de DNA nuclear e mitocondrial foram sequenciados para *Gyrodactylus* spp. (zinco metaloproteinase – ZMP; e citocromo oxidase II – COII) e *Scleromystax* spp. (partícula sinalizadora de 54kDa – SRP54; e D-loop). O relacionamento filogenético baseado nessas sequências de DNA forneceu suporte para linhagens de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*, as quais refletiram a distribuição geográfica das populações. A análise da associação parasito-hospedeiro revelou a alta especificidade de *Gyrodactylus* spp., porém os resultados sugerem que variações locais na interação parasito-

---

<sup>(\*)</sup> Capítulo formatado de acordo com as normas de publicação da revista *International Journal for Parasitology*.

hospedeiro estão mais relacionadas com eventos de troca de hospedeiro do que com o isolamento geográfico das populações. A reconstrução das datas de divergência (relógio molecular) para espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* descartou a hipótese de que a especiação desses parasitos tenha ocorrido simultaneamente com a dos hospedeiros (coespeciação). No entanto, a história demográfica de *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. sugere que retrações e expansões populacionais recentes estão associadas a flutuações climáticas do Período Quaternário. Os dados genéticos e morfométricos de *Scleromystax* e *Gyrodactylus* sugerem, portanto, que a estruturação geográfica é um fator determinante da diversificação genética, morfológica e, possivelmente, da adaptação local parasito-hospedeiro.

**Palavras-chave:** *Gyrodactylus*, *Scleromystax*, estruturação geográfica, adaptação morfológica, COII, D-loop.

## **Abstract**

**Co-phylogeography: evaluating the geographic structuring, historical demography and association between species of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) and hosts *Scleromystax* (Siluriformes: Callichthyidae) in southern Brazil**

The comparative phylogeography is an important method to investigate the influence of geographical and geological phenomena in the diversification and local adaptation of host-parasite systems. This study evaluates the influence of geographic structuring in the molecular evolution, morphological diversification and association between *Gyrodactylus* spp. and *Scleromystax* spp. in sub-basins of the coastal state of Paraná, Brazil. Adult specimens of *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) ( $n = 34$ ) and *Scleromystax barbatus* (Quoy and Gaimard, 1824) ( $n = 107$ ) were collected from rivers of the sub-basins of Paranaguá Bay and the Nhundiaquara River. We collected 313 specimens of four new species of *Gyrodactylus*. Nine

morphometric features of parasites and hosts were analyzed. The data revealed significant morphometric differences for populations of hosts ( $P < 0.001$ ) and parasites ( $P < 0.001$ ) from different rivers and sub-basins. Fragments of nuclear and mitochondrial DNA were sequenced for *Gyrodactylus* spp. (zinc metalloproteinase – ZMP, and cytochrome oxidase II – COII) and *Scleromystax* spp. (signal recognition particle 54kDa – SRP54, and D-loop). The phylogenetic analysis based on these DNA sequences provided support for lineages of *Gyrodactylus* and *Scleromystax*, which reflected the geographical distribution of populations. The analysis of host-parasite association revealed the high specificity of *Gyrodactylus* spp. but the results suggest that local variations in the parasite-host interaction are more related to host-switching events than to geographical isolation of populations. Reconstruction of divergence dates (molecular clock) for species of *Gyrodactylus* and *Scleromystax* rejects the hypothesis of host-parasite cospeciation. However, the demographic history of *Gyrodactylus* spp. and *Scleromystax* spp. suggests that recent population expansions and declines are associated to climatic fluctuations of the Quaternary Period. Morphometric and genetic data of *Gyrodactylus* and *Scleromystax* suggest that the geographic structuring is a determinant factor of genetic and morphologic diversification, and possibly the host-parasite local adaptation.

**Keywords:** *Gyrodactylus*, *Scleromystax*, geographic structuring, morphologic adaptation, COII, D-loop.

## 1. Introdução

Os Monogeneoidea representam um diverso grupo de parasitos de peixes, amplamente distribuído no mundo. Gyrodactylidae van Beneden et Hesse, 1863 inclui todas as espécies vivíparas dessa classe. Nessa família, *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 é o gênero com maior número de espécies conhecidas (Bakke et al., 2002, 2007; Boeger et al., 2003), das quais algumas são consideradas uma séria ameaça para populações de peixes (McVicar 1997; Bakke et al., 2002, 2007). São conhecidas pouco mais de 400 espécies de *Gyrodactylus* (Bakke et al., 2007).

A ampla diversificação de *Gyrodactylus* resulta da combinação de características biológicas (e.g. hiperviviparidade) que contribuem para a conquista de novos hospedeiros e dispersão entre ambientes geográficos distintos (Bakke et al., 2002; Cable e Harris, 2002; Morand et al., 2002; Boeger et al., 2003). Por esse motivo, muitos pesquisadores têm usado técnicas morfométricas (Shinn et al., 1996, 2001, 2004) e moleculares (Cunningham e Mo, 1997; Harris, 1998; Matejusová et al., 2001; Huyse e Volckaert, 2002; Zięta e Lumme, 2002, 2003; Hansen et al., 2003; Huyse et al., 2003, 2005; Meinilä et al., 2002, 2004; Cable et al., 2005; LeBlanc et al., 2006; Zięta et al., 2006; Bueno-Silva et al., 2011) para auxiliar na delimitação de espécies e linhagens de parasitos associados a localidades e hospedeiros distintos.

Alguns estudos têm evidenciado que a interação coevolutiva entre parasitos e hospedeiros depende não apenas de fatores ecológicos e genéticos, mas também geográficos (Kaltz e Shykoff, 1998; Thompson, 1999; Gandon e Michalakis, 2002; Dybdahl e Storfer, 2003; Prugnolle et al., 2005). A estruturação geográfica define a diversidade de padrões ecológicos e a dinâmica de coevolução das espécies, promovendo a adaptação local das populações (Thompson, 1999, 2005). Além disso, a estruturação geográfica é considerada um dos principais fatores determinantes da diversificação, adaptação local e composição de comunidades de parasitos (Poulin e Morand, 1999; Thompson, 1999; Gandon e Michalakis, 2002; Dybdahl e Storfer, 2003;

Prugnolle et al., 2005; Nuismer, 2006). Embora o processo de diversificação de *Gyrodactylus* seja amplamente reconhecido (Morand et al., 2002; Ziętara e Lumme, 2002; Boeger et al., 2003; Meinilä et al., 2004; Bueno-Silva et al., 2011), pouco se conhece sobre o papel da estruturação geográfica nesse contexto (Malmberg, 1970; Dmitrieva e Dimitrov, 2002; Meinilä et al., 2004).

Na região Neotropical, são conhecidas cerca de 40 espécies de Gyrodactylidae, das quais aproximadamente 20 são de *Gyrodactylus* (Boeger et al., 2006; Kritsky et al., 2007; Cohen e Kohn, 2008). No estado do Paraná (Brasil), são conhecidas quatro espécies de *Gyrodactylus* que compartilham espécies simpátricas de Callichthyidae (Popazoglo e Boeger, 2000; Bueno-Silva e Boeger, 2009). Essas espécies têm servido como modelo parasito-hospedeiro (Boeger et al., 2005; Bueno-Silva et al., 2011) para testar hipóteses sobre a diversificação e adaptação de espécies de *Gyrodactylus* (Boeger et al., 2003). De forma experimental (Boeger et al., 2005) e empírica (Bueno-Silva et al., 2011), esses estudos demonstraram que *Gyrodactylus* é capaz de explorar espécies distintas de hospedeiros em simpatria. Bueno-Silva et al. (2011) mostraram, ainda, que diferenças genéticas e morfológicas entre suprapopulações de *Gyrodactylus corydori* Bueno-Silva e Boeger, 2009 permitiram reconhecer linhagens de parasitos associados a espécies hospedeiras e localidades distintas. Esses dados corroboraram a hipótese de Boeger et al. (2003), de que a diversificação de *Gyrodactylus* está relacionada à conquista de um novo hospedeiro ou ambiente geográfico, o que poderia fornecer subsídios para compreender o papel da estruturação geográfica na relação parasito-hospedeiro e na diversidade genética e morfológica das populações.

De acordo com Thompson (1999), o estudo da relação parasito-hospedeiro é uma das principais formas de avaliar a adaptação local das espécies em ambientes geograficamente heterogêneos, já que o parasitismo é variável temporalmente e entre populações de hospedeiros. Segundo Thompson (1999), a variação espacial na interação parasito-hospedeiro é uma das maiores forças geradoras de diversidade biológica e contribui para seleção em mosaico (e.g. pressões seletivas atuando de forma diferenciada entre populações geograficamente isoladas). Os

padrões de diferenciação genética em pequena escala espacial podem contribuir com informações sobre o modo de dispersão e dinâmica evolutiva de espécies parasitas. Como as interações coevolutivas podem ser altamente divergentes no espaço e tempo, é importante quantificar e comparar a variação filogeográfica de parasitos e hospedeiros em sua extensão geográfica (Huyse et al., 2005). Partindo dessa premissa, esse estudo tem como objetivo avaliar a influência da estruturação geográfica na evolução molecular, diversidade morfológica e associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. na bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil.

Com base em estudos sobre dinâmica coevolutiva parasito-hospedeiro (Thompson, 1999; Desdevise et al., 2002; Huyse et al., 2003; Nieberding et al., 2004; Huyse e Volckaert, 2005), o estudo propõe responder as seguintes perguntas: (i) A associação parasito-hospedeiro varia entre populações geograficamente isoladas? (ii) O isolamento geográfico das populações reflete a codivergência adaptativa de linhagens de parasitos e seus hospedeiros? (iii) O grau de diferenciação genética e morfológica está relacionado ao isolamento geográfico das populações? (iv) A história demográfica das populações de parasitos é congruente com a de seus hospedeiros?

Segundo Page e Charleston (1998), a interação parasito-hospedeiro resulta de uma longa história coevolutiva das espécies. Em cada associação, uma espécie interage com outra em um nível de fidelidade dependente da frequência relativa de quatro categorias de eventos: codivergência, duplicação, transferência horizontal e extinção. Os autores argumentaram que diferentes tipos de associação podem gerar padrões variáveis de resposta, resultando em incongruências nas filogenias de parasitos e hospedeiros. Com base nessas observações, é possível hipotetizar que: (i) a associação parasito-hospedeiro poderia diferir entre populações de regiões distintas se as condições locais favorecessem eventos de troca de hospedeiro; (ii) o baixo fluxo gênico entre populações geograficamente distantes contribuiria para eventos de codivergência adaptativa (e.g. linhagens de parasitos associados a hospedeiros locais); (iii) à medida que o isolamento geográfico reduz a probabilidade de fluxo gênico entre populações,

esperaria-se que o grau de diversificação genética e morfológica seja proporcional à distância geográfica entre as populações; (iv) quanto mais íntima a relação parasito-hospedeiro (e.g. associação histórica), maior seria a probabilidade de que as espécies associadas apresentassem histórias demográficas congruentes entre si (e.g. coespeciação).

Para testar essas hipóteses, foram utilizados dois conjuntos de técnicas moleculares e morfométricas. O estudo molecular foi conduzido com marcadores de DNA mitocondrial (mtDNA) e DNA nuclear (nDNA). Os dados moleculares foram usados para inferir a história demográfica, estruturação genética das populações e associação entre parasitos e hospedeiros. Os dados morfométricos foram usados para avaliar o grau de diferenciação morfológica e sua relação com a diversidade genética e distribuição geográfica das populações.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Área de estudo e coleta de amostras

A área de estudo compreende duas sub-bacias da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil: sub-bacia da baía de Paranaguá e sub-bacia do rio Nhundiaquara (Fig. 1). A escolha dessas localidades foi realizada com base no pressuposto de que as características topográficas e a história geomorfológica da região (Bigarella, 2001; Maack, 2001) poderiam contribuir para testar hipóteses de filogeografia e genética de populações.

No litoral do estado do Paraná, são conhecidas duas espécies de *Scleromystax*, que ocorrem na bacia da baía de Paranaguá e de Guaratuba (Grando, 1999 – dissertação, UFPR). Espécimes adultos de *Scleromystax macropterus* (Regan, 1913) e *Scleromystax barbatus* (Quoy e Gaimard, 1824) foram coletados (licença do IBAMA nº. 11617/2008). *Scleromystax macropterus* foi coletado na sub-bacia da baía de Paranaguá ( $n = 34$ ), no rio Fortuna (25°39'54"S, 48°31'05"W), município de Pontal do Paraná. *Scleromystax barbatus* foi coletado na sub-bacia da baía de

Paranaguá ( $n = 63$ ), no rio Ribeirão (25°36'02"S, 48°37'19"W), município de Paranaguá, e no rio Fortuna (25°39'54"S, 48°31'05"W), município de Pontal do Paraná; e na sub-bacia do rio Nhundiaquara ( $n = 44$ ), no rio do Pinto (25°30'50"S, 48°50'34"W) e no rio Marumbi (25°30'54"S, 48°52'03"W), município de Morretes. O método de coleta dos parasitos foi o mesmo de Bueno-Silva e Boeger (2009): os peixes hospedeiros foram coletados com auxílio de pesca elétrica e puçá, e em seguida acondicionados em recipientes contendo água aquecida a 60 °C e agitados vigorosamente. Amostras de tecido de parasitos e hospedeiros foram fixadas com etanol 95% e armazenadas a -20 °C. Amostras de tecido dos hospedeiros foram acondicionadas em solução saturada de DMSO. Espécimes de *Gyrodactylus* foram coletados das amostras com auxílio de um estereomicroscópio.

Dois conjuntos de técnicas morfométricas e moleculares foram usados como fontes independentes de evidência. O estudo morfométrico e molecular foram conduzidos para hospedeiros e parasitos (veja itens 2.2 e 2.3 abaixo). A terminologia ecológica foi usada de acordo com Bush et al. (1997).

## 2.2. Estudo morfométrico

### 2.2.1. Hospedeiros

As distâncias morfométricas dos peixes hospedeiros foram obtidas com auxílio de um paquímetro analógico com precisão de 0,05 mm. As distâncias morfométricas foram as mesmas usadas por Shibatta e Hoffmann (2005), porém foram consideradas apenas medidas que apresentaram alta correlação (correlação de Pearson maior que 0,9), coeficiente de variação menor que 20% e ausência de redundância geométrica, para evitar medidas redundantes e índices elevados de erro de medida. Com base nesses parâmetros, foram obtidas nove distâncias morfométricas de cada hospedeiro (Fig. 2): comprimento do focinho (CF), comprimento da cabeça (CC), distância pré-dorsal (DPD), altura do corpo (AC), comprimento da base da



nadadeira dorsal (CBD), distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (DDAD), comprimento da base da nadadeira anal (CBA), altura do pedúnculo caudal (APC) e comprimento padrão (CP). Essas medidas são apresentadas em centímetros. Os dados morfométricos foram logaritmizados (logaritmo natural) e avaliados por análise discriminante, análise multivariada de variância (MANOVA) e análise de componentes principais (PCA) usando o programa Statistica 7.0 (Statsoft). A PCA foi realizada com base na matriz de covariância das medidas morfométricas.

### 2.2.2. Parasitos

O háptor de cada parasito foi separado do tronco e montado em lâmina com meio de Hoyer, para identificação morfológica, enquanto que o tronco foi usado para extração e análise de DNA. Essa técnica oferece a vantagem de obter dados genéticos e morfológicos do mesmo indivíduo. O estudo morfométrico dos parasitos foi conduzido com espécimes montados em lâmina, clarificados com meio de Hoyer. Imagens desses espécimes foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (Olympus QColor 5) acoplada a um microscópio óptico com contraste de fase (Olympus BX 51). As distâncias morfométricas de âncora e gancho foram obtidas a partir dessas imagens com auxílio do programa SigmaScan Pro 5.0 (SPSS). As medidas morfométricas foram as mesmas usadas por Bueno-Silva (capítulo II, Figs. 1, 2): abertura da ponta da âncora (APA), largura da lâmina da âncora (LLA), ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA), comprimento da curva interna da âncora (CCIA), comprimento total da âncora (CTA), comprimento da haste do gancho (CHG), comprimento da cabeça do gancho (CCG), abertura da ponta do gancho (APG) e largura distal do gancho (LDG). As medidas são apresentadas em micrômetros, com exceção da medida AAPA (em graus). Os dados foram logaritmizados (logaritmo natural) e avaliados por análise discriminante, análise multivariada de variância (MANOVA), análise de componentes principais (PCA) e análise de cluster. A análise discriminante, MANOVA e PCA foram realizadas com o programa Statistica 7.0 (Statsoft) e a

análise de cluster com o programa PAST 2.06 (Hammer et al., 2001). A PCA foi realizada com base na matriz de correlação das medidas morfométricas. A análise de cluster foi realizada com o método de Ward (1963) baseado na distância Euclidiana das medidas.

### *2.3. Estudo molecular*

#### *2.3.1. Hospedeiros*

O estudo molecular dos hospedeiros foi conduzido com dois marcadores moleculares de DNA: a região controle (D-loop) do DNA mitocondrial (mtDNA) e o gene SRP54 (partícula sinalizadora de 54kDa) do DNA nuclear (nDNA). Esses marcadores foram escolhidos por sua ampla aplicação em estudos de genética de populações de peixes (Jarman et al., 2002; Montoya-Burgos, 2003; Liu et al., 2006; Ramírez-Macías et al., 2007; Comesaña et al., 2008).

O DNA total dos hospedeiros foi extraído usando kit de extração EZ-DNA (Biosystems) ou DNeasy (Qiagen), seguindo o protocolo dos fabricantes. Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores de Montoya-Burgos (2003) foram usados para amplificar e sequenciar fragmentos da região D-loop: DLA-D (5'-TCCYACCCCTAACTCCCAAAG-3'), DLA-R (5'-AGTCAGGACCAARCCTTTGTGC-3'), DLB-D (5'-AGCRYCGGTCTTGTAATCCG-3') e DLB-R (5'-GGYYCATCTTGACATCTTCAG-3'). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região D-loop continha: 1–2 µl de amostra de DNA (30 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerase (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63 °C, 35 s a 72 °C e extensão final de 2 min a 72 °C.

Um par de oligonucleotídeos iniciadores de Jarman et al. (2002) foi usado para amplificar e sequenciar um fragmento do gene SRP54: SRP54f1 (5'-ATGGGTGAYATYGAA-GGACTGATWGATAAAGTCAA-3') e SRP54r1 (5'-TTCATGATGTTYTGGAATTG-

YTCATACATGTC-3'). A solução da PCR para amplificação desse gene continha: 1–2 µl de amostra de DNA (30 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Polimerase (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 30 s a 72 °C e extensão final de 2 min a 72 °C.

Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e purificados com kit MinElute (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com Big Dye 3.1 e analisada em um sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

### 2.3.2. Parasitos

O estudo molecular dos parasitos foi conduzido com três marcadores de DNA: gene citocromo oxidase II (COII) do mtDNA, gene zinco metaloproteinase (ZMP) do nDNA e espaçador transcrito interno 1 (ITS1)–ITS2. O gene COII foi escolhido por demonstrar ser um potencial marcador molecular para estudos filogenéticos de *Gyrodactylus* (veja Bueno-Silva, capítulo I e II); e o gene ZMP por ser um marcador de ampla aplicação em estudos de genética de populações (Jarman et al., 2002).

O DNA total dos parasitos foi extraído usando o kit de extração DNeasy (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante, com exceção da eluição final que foi realizada com 50 µl. Os oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificação e sequenciamento do gene COII foram os mesmos de Bueno-Silva (capítulo I): COX2F (5'-TACAYAYCGCCCGTCAAYYTCG-3'), COX2R (5'-AATAMWKATWGGCATRWAAGARTG-3') e COX2R2 (5'-TTACCGCTT-CCYTGAACACG-3'). A solução da PCR para amplificação desse gene continha: 3 µl de amostra de DNA (10–20 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até

completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 42–50 °C, 45 s a 72 °C e extensão final de 4 min a 72 °C.

Um par de oligonucleotídeos iniciadores de Jarman et al. (2002) foi usado para amplificar e sequenciar um fragmento do gene ZMP: ZMPf1 (5'-CATGARRTTGG-MCATAAYTTTGGATC-3') e ZMPr1 (5'-AKCCACARTCRCATTCTCDCC-3'). A solução da PCR para amplificação desse gene continha: 2–3 µl de amostra de DNA (10–20 ng), 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Platinum Taq (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,6 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C, 30 s a 72 °C e extensão final de 1 min a 72 °C.

A amplificação de ITS1–ITS2 foi realizada com os iniciadores de Ziętara et al. (2000): ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3') e ITS2 (5'-GGTAATCACGCTTGAATC-3'). A PCR para amplificação de ITS continha 3 µl de amostra de DNA, 0,4 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq Platinum (Invitrogen), PCR-buffer (1X), 0,5 pmoles de cada iniciador e água autoclavada até completar volume final de 25 µl. As condições da PCR nessa amplificação foram as seguintes: 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 1 min a 95°C, 45 s a 50°C, 1 min a 72°C e extensão final de 5 min a 72°C.

### *2.3.3. Análise filogenética*

As sequências de DNA foram editadas com os programas Staden Package 1.7 (Bondfield et al., 1995, disponível em <http://staden.sourceforge.net>) e BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) e alinhadas com o programa MUSCLE 3.7 (Edgar, 2004) implementado no portal CIPRES 3.1 (Miller et al., 2009, disponível em <http://www.phylo.org>). As filogenias resultantes das análises moleculares foram visualizadas e editadas com o programa FigTree 1.3.1 (Rambaut, 2009, disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

Os programas jModelTest 1.1 (Posada, 2008) e ProtTest 2.4 (Abascal et al., 2005) foram usados, respectivamente, para selecionar o modelo mais apropriado de evolução molecular de nucleotídeos (TPM2uf+ $\Gamma$  para COII; TVM+ $\Gamma$  para ZMP) e aminoácidos (WAG+I para COII) das sequências de *Gyrodactylus*. O relacionamento filogenético baseado nas sequências nucleotídicas de COII e ZMP foi inferido por análise Bayesiana implementada no programa BEAST 1.6 (Drummond e Rambaut, 2007). Valores de probabilidade posterior foram estimados com dados particionados (COII) (uma partição para cada códon) e não particionados (ZMP), quatro corridas independentes com 20.000.000 de gerações, amostragem a cada 1.000 árvores, “burn-in” de 2.000 árvores e frequência de bases estimada. Fragmentos de COII e ZMP foram sequenciados para duas amostras de *G. corydori* e usados como grupo externo nas análises filogenéticas.

Fragmentos de COII foram sequenciados para amostras de *G. corydori* ( $n = 13$ ), a fim de estimar a taxa evolutiva desse gene com base na datação obtida por Bueno-Silva et al. (2011) para o clado de *G. corydori* (150.000 anos). Assim, a taxa evolutiva de COII foi estimada em 13,3% por milhão de anos (Ma). Essa taxa foi usada para inferir as datas de divergência de clados de espécies de *Gyrodactylus* com base em um modelo de relógio molecular fixo implementado no programa BEAST 1.6. A história demográfica das populações de *Gyrodactylus* foi inferida pelo método de coalescência Bayesiana (“Bayesian skyline plots”) com os programas BEAST 1.6 e Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond, 2007, disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk>), usando os mesmos parâmetros da análise Bayesiana descritos acima. As árvores filogenéticas foram simuladas usando coalescência Bayesiana e modelo de população constante. A possível ocorrência de mudanças na história demográfica das populações de *Gyrodactylus* foi também avaliada pelo teste de neutralidade de Tajima (D) (Tajima, 1989) e pela análise das diferenças pareadas (“mismatch distribution”) (Rogers e Harpending, 1992) usando o programa DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009).

Análise de variância molecular (AMOVA) e estatística F ( $F_{st}$ ) foram realizadas para estimar o grau de diferenciação genética intra e interpopulações com auxílio do programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). A AMOVA e o índice  $F_{st}$  foram calculados com base na matriz de distância pareada entre haplótipos sob 10.000 permutações. A distância nucleotídica baseada em COII e ZMP foi inferida com o programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011, disponível em <http://www.megasoftware.net>).

O programa TranslatorX (Abascal et al., 2010) foi usado para inferir as sequências de aminoácidos de COII. O relacionamento filogenético baseado nessas sequências foi inferido por análise Bayesiana implementada no programa BEAST 1.6. Valores de probabilidade posterior foram estimados a partir de duas corridas independentes com 20.000.000 de gerações, amostragem a cada 1.000 árvores e “burn-in” de 2.000 árvores. O teste-Z foi usado para testar a hipótese nula de seleção neutra em COII e ZMP com auxílio do programa MEGA 5. A variância das diferenças nucleotídicas (códon) foi computada sob 1.000 repetições, usando o método de Nei-Gojobori.

O relacionamento filogenético das espécies de *Gyrodactylus* foi avaliado também pela análise comparativa da estrutura secundária de ITS2 (Coleman, 2009). O consenso da estrutura secundária de ITS2 de cada espécie foi inferido com o programa RNAalifold (Bernhart et al., 2008) implementado no servidor Vienna RNA package 2.0 (Hofacker, 2003).

A probabilidade de especificidade ao hospedeiro das espécies de *Gyrodactylus* foi calculada pelo método de reconstrução de caráter ancestral por parcimônia (Maddison, 1995) com auxílio do programa Mesquite 2.7.4 (Maddison e Maddison 2010, disponível em <http://mesquiteproject.org>). Esse método permite testar se a distribuição de espécies de parasitos, entre hospedeiros distintos, é casual ou não. Para isso, os hospedeiros foram mapeados na árvore filogenética dos parasitos como se fossem caracteres. A aleatorização dos caracteres na árvore filogenética, realizada sob 3.000 repetições, revela a distribuição e a frequência do número de eventos de troca de hospedeiro. A partir desses dados, foi possível avaliar se a associação

parasito-hospedeiro observada é significativamente diferente daquela obtida ao acaso, i.e. se a espécie parasita não apresenta nenhuma especificidade pela espécie hospedeira. Uma distribuição significativamente diferente do acaso ( $P < 0,05$ ) denota especificidade do parasito pela espécie hospedeira.

O programa jModelTest 1.1 foi usado para selecionar o modelo mais apropriado de evolução molecular de nucleotídeos (HKY+ $\Gamma$  para D-loop; TrN+ $\Gamma$  para SRP54) das sequências de *Scleromystax*. O relacionamento filogenético baseado nas sequências de D-loop e SRP54 foi inferido por análise Bayesiana implementada no programa BEAST 1.6. Valores de probabilidade posterior foram estimados com dados não particionados, quatro corridas independentes com 20.000.000 de gerações, amostragem a cada 1.000 árvores, “burn-in” de 2.000 árvores e frequência de bases estimada. Fragmentos de D-loop e SRP54 foram sequenciados para duas amostras de *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) e usados como grupo externo nas análises filogenéticas.

A taxa evolutiva de D-loop (0,93% por Ma), estimada por Montoya-Burgos (2003) para uma espécie de Siluriformes, foi usada para inferir as datas de divergência de clados de *Scleromystax* com base em um modelo de relógio molecular fixo implementado no programa BEAST 1.6. A história demográfica das populações foi inferida por coalescência Bayesiana (“Bayesian skyline plots”) com os programas BEAST 1.6 e Tracer 1.5, usando os mesmos parâmetros da análise Bayesiana descritos acima. As árvores foram simuladas usando coalescência Bayesiana e modelo de população constante. A possível ocorrência de mudanças na história demográfica das populações de *Scleromystax* foi também avaliada pelo teste de neutralidade D de Tajima e pela análise das diferenças pareadas usando o programa DnaSP 5.0.

A AMOVA e o índice  $F_{st}$  foram calculados com base na matriz de distância pareada entre haplótipos, sob 10.000 permutações, usando o programa Arlequin 3.5. A distância nucleotídica baseada em D-loop e SRP54 foi inferida com o programa MEGA 5.

Diferenças no tamanho de fragmentos de D-loop foram analisadas com o programa TRF 4.4 (Benson, 1999), a fim de rastrear padrões de repetição em tandem<sup>(1)</sup> nas sequências de DNA. Possíveis variações moleculares entre populações de *Scleromystax* foram avaliadas também pela análise comparativa da estrutura secundária de D-loop. O consenso da estrutura secundária de D-loop das populações foi inferido com o programa RNAalifold implementado no servidor Vienna RNA package 2.0.

Partindo da hipótese de que possíveis variações morfológicas entre populações de parasitos e de hospedeiros poderiam resultar da divergência genética entre populações geograficamente isoladas, seria possível esperar uma correlação positiva entre o grau de divergência morfológica e genética das populações. Essa hipótese foi testada pelo método de correlação de Mantel das matrizes de distância morfométrica, genética e geográfica das populações de parasitos e hospedeiros. As matrizes foram permutadas ( $n = 1.000.000$ ) com o programa ZT 1.1 (Bonnet e Van de Peer, 2002). A matriz de distância morfométrica foi calculada com base na distância Euclidiana das medidas morfométricas. A matriz de distância genética (em % de diferenças nucleotídicas) foi calculada com base em sequências de COII (parasitos) e D-loop (hospedeiros). A matriz de distância geográfica (em km) foi inferida a partir das coordenadas geográficas das populações (veja item 2.1) com auxílio do programa GDMG 1.2.3 (Ersts, 2007, disponível em [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg)).

A análise cofilogeográfica foi conduzida apenas para *S. barbatus* e *Gyrodactylus* n.sp. 3, pois somente essas espécies foram encontradas em todas as localidades amostradas.

---

<sup>(1)</sup> Repetição em tandem: ocorrência de duas ou mais repetições idênticas e adjacentes de DNA no mesmo sentido.



### 3. Resultados

#### 3.1. Identificação das espécies parasitas

Foram coletados 313 espécimes de *Gyrodactylus* em *S. barbatus* e *S. macropterus*. Foram reconhecidas quatro espécies novas de *Gyrodactylus* (veja Bueno-Silva, capítulo II): *Gyrodactylus* n.sp. 1 ( $n = 90$ ), *Gyrodactylus* n.sp. 2 ( $n = 124$ ), *Gyrodactylus* n.sp. 3 ( $n = 92$ ) e *Gyrodactylus* n.sp. 4 ( $n = 7$ ). A ocorrência, prevalência e intensidade média de cada espécie parasita são apresentadas na Tabela 1.

#### 3.2. Estudo morfométrico

##### 3.2.1. Hospedeiros

As distâncias morfométricas de *S. barbatus* e *S. macropterus* são apresentadas na Tabela 2. O resultado da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de *S. barbatus* e *S. macropterus* revelou que os dois primeiros fatores representaram 94% da variação morfométrica entre as duas espécies (Tabela 3). O primeiro fator mostrou todas as variáveis com escores maiores que 0,7 (Tabela 4).

O resultado da análise multivariada de variância (MANOVA) mostrou diferenças morfométricas significativas ( $F = 34,6$ ;  $P < 0,001$ ) entre as duas espécies hospedeiras. A análise univariada dessas medidas revelou diferenças significativas em sete distâncias morfométricas: distância pré-dorsal (DPD) ( $F = 28,7$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento do focinho (CF) ( $F = 80,28$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento da cabeça (CC) ( $F = 29,96$ ;  $P < 0,001$ ), altura do corpo (AC) ( $F = 18,53$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD) ( $F = 16,65$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento padrão (CP) ( $F = 38,81$ ;  $P < 0,001$ ) e distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (DDAD) ( $F = 28,83$ ;  $P < 0,001$ ). O resultado da análise discriminante também mostrou diferenças

significativas (Wilks' lambda = 0,2;  $F = 53,61$ ;  $P < 0,001$ ) entre *S. barbatus* e *S. macropterus* em seis medidas morfométricas (Tabela 5), as quais permitiram distinguir ambas as espécies em 99% dos casos, em média. A classificação morfométrica das espécies de *Scleromystax* coincidiu, em 99% dos casos, com a prévia identificação baseada em características morfológicas.

O resultado da PCA das distâncias morfométricas de *S. barbatus* mostrou os dois primeiros fatores representando 94% da variação morfométrica observada entre populações da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara (Tabela 6). O primeiro fator mostrou todas as variáveis com escores maiores que 0,7 (Tabela 7). Essas variáveis foram as mesmas que contribuíram para a variação morfométrica observada entre *S. barbatus* e *S. macropterus* (veja Tabela 4).

O resultado da MANOVA mostrou variações morfométricas significativas entre populações de *S. barbatus* coletadas em sub-bacias ( $P < 0,001$ ) e rios distintos ( $P < 0,001$ ) (Tabela 8). O resultado da análise discriminante também revelou diferenças morfométricas significativas que permitiram distinguir populações de *S. barbatus* coletadas em sub-bacias (Wilks' lambda = 0,28;  $F = 20,48$ ;  $P < 0,001$ ) e rios distintos (Wilks' lambda = 0,18;  $F = 10,29$ ;  $P < 0,001$ ). Sete medidas morfométricas permitiram distinguir populações de *S. barbatus* de diferentes sub-bacias (Tabela 9) em 92% dos casos, em média. A análise univariada dessas medidas mostrou diferenças significativas em quatro distâncias morfométricas: comprimento da base da nadadeira anal (CBA) ( $F = 7,28$ ;  $P < 0,01$ ), comprimento padrão (CP) ( $F = 27,32$ ;  $P < 0,001$ ), altura do pedúnculo caudal (APC) ( $F = 36,94$ ;  $P < 0,001$ ) e comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD) ( $F = 27,92$ ;  $P < 0,01$ ). Sete medidas morfométricas permitiram distinguir populações de *S. barbatus* de diferentes rios (Tabela 10) em 83% dos casos, em média. A análise univariada dessas medidas mostrou diferenças significativas em cinco distâncias morfométricas: comprimento da base da nadadeira anal (CBA) ( $F = 4,32$ ;  $P < 0,05$ ), comprimento padrão (CP) ( $F = 11,92$ ;  $P < 0,001$ ), altura do pedúnculo caudal (APC) ( $F = 14,58$ ;  $P < 0,001$ ), comprimento do focinho (CF) ( $F = 14,2$ ;  $P < 0,001$ ) e altura do corpo (AC) ( $F =$

10,29;  $P < 0,05$ ). Das medidas morfométricas que permitiram distinguir populações de *S. barbartus* entre sub-bacias e rios distintos, seis medidas foram coincidentes em ambas as análises: comprimento da base da nadadeira anal (CBA), comprimento padrão (CP), altura do pedúnculo caudal (APC), altura do corpo (AC), comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD) e distância pré-dorsal (DPD). Porém, o teste de Mantel mostrou pouca correlação ( $r^2 = 0,005$ ;  $P < 0,05$ ) entre variação morfométrica e distância geográfica (distância por terra) das populações de *S. barbartus*.

### 3.2.2. Parasitos

O resultado da análise de cluster, baseado nas distâncias morfométricas de âncoras e ganchos de *Gyrodactylus* spp., revelou uma similaridade morfológica entre espécies parasitas que compartilham a mesma espécie hospedeira e a diferenciação morfológica entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de localidades distintas (Fig. 3).

O resultado da PCA das distâncias morfométricas de *Gyrodactylus* n.sp. 3 mostrou os três primeiros fatores com autovalores acima da média, representando 70% da variação morfométrica entre suprapopulações da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara (Tabela 11). O primeiro fator mostrou quatro variáveis com escore igual ou maior que 0,7 (Tabela 12): comprimento da curva interna da âncora (CCIA), ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA), comprimento da cabeça do gancho (CCG) e abertura da ponta do gancho (APG). Essas medidas estão entre aquelas que mais contribuíram para a variação morfométrica observada entre as quatro espécies de *Gyrodactylus* (Bueno-Silva, capítulo II).

O resultado da MANOVA mostrou variações morfométricas significativas entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletadas em sub-bacias ( $P < 0,05$ ) e rios distintos ( $P < 0,001$ ) (Tabela 13). O resultado da análise discriminante também mostrou diferenças morfométricas significativas que permitiram distinguir suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletadas em sub-bacias (Wilks' lambda = 0,71;  $F = 5,27$ ;  $P < 0,01$ ) e rios distintos (Wilks'

$\lambda = 0,47$ ;  $F = 5,85$ ;  $P < 0,001$ ). Quatro medidas morfométricas permitiram distinguir suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de diferentes sub-bacias (Tabela 14) em 73% dos casos, em média. A análise univariada dessas medidas mostrou diferença significativa em uma distância morfométrica: comprimento da curva interna da âncora (CCIA) ( $F = 15,2$ ;  $P < 0,001$ ). Quatro medidas morfométricas permitiram distinguir suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de diferentes rios (Tabela 15) em 67% dos casos, em média. A análise univariada dessas medidas mostrou diferenças significativas em duas distâncias morfométricas: comprimento da curva interna da âncora (CCIA) ( $F = 9,07$ ;  $P < 0,05$ ) e ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA) ( $F = 15,37$ ;  $P < 0,001$ ). Das medidas morfométricas que permitiram distinguir suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 entre sub-bacias e rios distintos, duas medidas foram coincidentes em ambas análises: comprimento da curva interna da âncora (CCIA) e largura distal do gancho (LDG). Entretanto, o teste de Mantel mostrou pouca correlação ( $r^2 = 0,05$ ;  $P < 0,001$ ) entre variação morfométrica e distância geográfica das suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3.

### 3.3. Estudo molecular

#### 3.3.1. Hospedeiros

Foram obtidas 56 sequências do gene SRP54, das quais 20 são de *S. macropterus* e 36 de *S. barbatus* (sendo 20 de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá e 16 de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara). As duas espécies apresentaram um fragmento de 253 pb, constituído de dois éxons (um com 89 pb e outro com 43 pb) e um íntron (121 pb). Os éxons apresentaram códon inicial ATG e códon de parada TGA. O íntron apresentou sítios dinucleotídicos inicial (GT) e final (AG) característicos.

O relacionamento filogenético baseado nas sequências de SRP54 (Fig. 4), de acordo com análise bayesiana, mostrou suporte para dois clados de espécies de *Scleromystax*, os quais coincidiram com a prévia identificação morfológica. Além disso, a topologia resultante forneceu

suporte para linhagens de *S. barbatus* que refletiram a distribuição geográfica de populações de sub-bacias distintas. A divergência nucleotídica de SRP54 entre *S. barbatus* e *S. macropterus* foi de 3%, ao passo que a divergência nucleotídica entre populações de *S. barbatus* de sub-bacias distintas foi de 1%.

Na análise de variabilidade interespecífica, as sequências de SRP54 de *S. barbatus* e *S. macropterus* apresentaram 15 sítios polimórficos (éxon + íntron). Entre as espécies, foram constatados sete sítios polimórficos na região dos éxons (cinco substituições sinônimas e três substituições não sinônimas) e oito sítios polimórficos na região do íntron (oito mutações). Na análise de variabilidade intraespecífica dos éxons, *S. macropterus* apresentou apenas um sítio polimórfico e uma mutação (substituição sinônima); *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentou cinco sítios polimórficos e seis mutações (quatro substituições sinônimas e duas não sinônimas); e *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou quatro sítios polimórficos e quatro mutações (três substituições sinônimas e uma não sinônima). Na região do íntron, *S. macropterus* apresentou apenas um sítio polimórfico (uma mutação); *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentou dois sítios polimórficos (duas mutações); e *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou dois sítios polimórficos (duas mutações). O número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre sequências de *S. macropterus* foi de 0,84; entre sequências de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá foi de 2,0; e entre sequências de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara foi de 1,73.

Foram obtidas 46 sequências da região D-loop, das quais 15 são de *S. macropterus* e 31 de *S. barbatus* (sendo 18 de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá e 13 de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara). O tamanho total do fragmento de D-loop variou entre as espécies: *S. macropterus* apresentou 947 pb, enquanto que *S. barbatus* apresentou diferentes tamanhos, variando entre 1068 e 1289 pb.

Populações de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentaram tamanhos de fragmento variando entre 1068–1289 pb, enquanto que populações da sub-bacia do rio

Nhundiaquara fragmentos variando entre 1086–1206 pb. Variações intra e interpopulacionais no tamanho do fragmento de D-loop de *S. barbatus* resultaram da presença de fragmentos de nucleotídeos repetidos em tandem. Foram detectados dois padrões de repetição em tandem: padrão I (5'-ACATATATGTATGTACTAAATACATAATATGTATAATATT-3'), com 40 pb, e padrão II (5'-TATGTATAACATCACATATATATA-3'), com 24 pb. Populações de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentaram os dois padrões de repetição em tandem, ao passo que populações da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentaram somente repetições do padrão I. O número de cópias do padrão I em populações da sub-bacia do rio Nhundiaquara (6–9 cópias) foi diferente do número de cópias observado em populações da sub-bacia da baía de Paranaguá (5–11 cópias). Por outro lado, o número de cópias do padrão II (duas cópias) não variou entre populações da sub-bacia da baía de Paranaguá. Todos os fragmentos com repetições em tandem ocorreram na mesma porção inicial (5') do D-loop, entre o sexagésimo (60°) e quingentésimo (500°) sítio. Diferentes tamanhos de fragmento revelaram alterações marcantes na estrutura secundária de D-loop que permitiram distinguir populações de *S. barbatus* de diferentes sub-bacias (Fig. 5).

O relacionamento filogenético baseado nas sequências de D-loop (Fig. 6), de acordo com análise bayesiana, forneceu suporte para dois clados de espécies de hospedeiros, que coincidiram com a prévia identificação morfológica. Além disso, a topologia resultante forneceu suporte para linhagens de *S. barbatus* que refletiram a distribuição geográfica de populações de sub-bacias distintas (Fig. 6). A divergência nucleotídica de D-loop entre *S. barbatus* e *S. macropterus* foi de 8%, ao passo que a divergência nucleotídica entre populações de *S. barbatus* de sub-bacias distintas foi de 0,7%. Foram detectados sete haplótipos (H1–H7) em *S. macropterus* e 26 haplótipos em *S. barbatus* (nove haplótipos (H8–H16) de *S. barbatus* foram exclusivos de populações da sub-bacia do rio Nhundiaquara, 16 haplótipos (H18–H33) foram exclusivos de populações da sub-bacia da baía de Paranaguá e um haplótipo (H17) foi compartilhado por dois indivíduos de sub-bacias distintas) (Fig. 6). A análise concatenada de fragmentos de SRP54 e D-

loop, de acordo com inferência bayesiana, revelou uma topologia muito semelhante àquela obtida com sequências de D-loop. Por essa razão, esses dados não foram mostrados aqui.

Na análise de variabilidade interespecífica, as sequências de D-loop de *S. barbatus* e *S. macropterus* apresentaram 516 sítios polimórficos, sendo 114 sítios com mutações (120 substituições) e 404 sítios com “indels” (i.e. deleções ou inserções na sequência de DNA). Na análise de variabilidade intraespecífica, *S. macropterus* apresentou 11 sítios polimórficos e 11 mutações (10 transições e uma transversão); *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentou 264 sítios polimórficos (37 sítios com substituições e 238 sítios com “indels”) e 38 mutações (32 transições e seis transversões); e *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou 142 sítios polimórficos (21 sítios com substituições e 121 sítios com “indels”) e 21 mutações (19 transições e duas transversões). O número médio de diferenças nucleotídicas ( $k$ ) entre sequências de *S. macropterus* foi de 2,3; entre sequências de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá foi de 5,41; e entre sequências de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara foi de 5,14.

A reconstrução das datas de divergência (tempo até o ancestral comum mais recente – TMRCA) para *S. macropterus* e *S. barbatus*, inferida com o programa BEAST 1.6 com base nas sequências de D-loop, sugere que essas espécies divergiram há, aproximadamente, 6,27 Ma (95% da densidade posterior (HPD) = 4,75–8,12 Ma). O TMRCA para os haplótipos de *S. macropterus* foi estimado em 323.000 anos (95% HPD = 170.000–530.000 anos) e para os haplótipos de *S. barbatus* em 722.100 anos (95% HPD = 500.000–970.000 anos). O TMRCA para os haplótipos de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara foi estimado em 543.100 anos (95% HPD = 330.000–790.000 anos) e para os haplótipos de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá estimado em 675.900 anos (95% HPD = 480.000–910.000 anos).

A AMOVA mostrou pouca estruturação genética ( $F_{st} = 0,08$ ;  $P = 0,05$ ) entre populações de *S. barbatus* de sub-bacias distintas. A porcentagem de variação genética entre populações de diferentes sub-bacias (8,5%) foi menor do que a variação intrapopulacional (91,5%). Por outro

lado, a AMOVA mostrou elevada estruturação genética ( $F_{st} = 0,23$ ;  $P < 0,001$ ) entre populações de *S. barbatus* de rios distintos (sem considerar a localidade das sub-bacias). Nessa análise, a porcentagem de variação genética entre populações de diferentes rios (24%) foi menor do que a variação intrapopulacional (76%).

De acordo com o teste de Mantel, não houve correlação entre o grau de diferenciação morfológica e genética ( $r^2 = -0,002$ ;  $P > 0,05$ ) entre populações de *S. barbatus*, o que sugere que diferenças morfométricas interpopulacionais não resultaram simplesmente de variação neutra entre linhagens genéticas de *S. barbatus*. O teste de Mantel também mostrou pouca correlação entre distância geográfica e diferenciação genética entre populações de *S. barbatus* ( $r^2 = 0,10$ ;  $P < 0,001$ ).

A análise da história demográfica (Fig. 7) e valores negativos do teste de neutralidade D de Tajima para *S. macropterus* ( $D = -1,23$ ;  $P > 0,05$ ) e *S. barbatus* ( $D = -2,03$ ;  $P < 0,05$ ) sugerem expansão populacional nas duas espécies. Porém, o resultado significativo obtido para *S. barbatus* ( $P < 0,05$ ) revelou que mutações genéticas entre populações de sub-bacias distintas não ocorreram sob seleção neutra (i.e. diferentemente do que seria esperado para mudanças aleatórias e neutras no DNA). O teste de neutralidade realizado separadamente para populações de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá ( $D = -1,20$ ;  $P > 0,05$ ) e da sub-bacia do rio Nhundiaquara ( $D = -1,15$ ;  $P > 0,05$ ) também sugere a expansão demográfica dessas populações, porém os resultados não significativos indicam mutações genéticas intrapopulacionais sob seleção neutra. A análise da história demográfica dos hospedeiros mostrou que a expansão populacional de *S. macropterus* e *S. barbatus* ocorreu na mesma época há, aproximadamente, 250.000 anos (Fig. 7).

### 3.3.2. Parasitos

A divergência nucleotídica entre espécies de *Gyrodactylus*, com base nos marcadores moleculares COII, ZMP e ITS1–ITS2, é apresentada na Tabela 16. A divergência genética entre



*Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3, com base em ZMP (2%) e ITS (3%), foi diferente daquela obtida para as outras espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax*: 17% para ZMP e 29–31% para ITS (Tabela 16). Entretanto, a análise comparativa da estrutura secundária de ITS2 revelou diferenças moleculares interespecíficas, especialmente na hélice III, que permitiram confirmar o status taxonômico de *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3 (Fig. 8). Além disso, as espécies variaram quanto ao número de hélices na estrutura secundária (veja Fig. 8) e no tamanho de fragmento de ITS2 (*Gyrodactylus* n.sp. 1 com 657 pb, *Gyrodactylus* n.sp. 2 com 623 pb, *Gyrodactylus* n.sp. 3 com 622 pb e *Gyrodactylus* n.sp. 4 com 663 pb).

Foram obtidas 71 sequências do gene nuclear ZMP, das quais 16 são de *Gyrodactylus* n.sp. 1, 18 de *Gyrodactylus* n.sp. 2 e 37 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 (sendo 18 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá e 19 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara). Não foi possível sequenciar ZMP para amostras de *Gyrodactylus* n.sp. 4 devido a dificuldades de amplificação. As três espécies de *Gyrodactylus* apresentaram tamanhos diferentes de fragmento de ZMP (Tabela 17), sendo que essa variação de tamanho ocorreu principalmente devido a “indels” na região do íntron (veja detalhes abaixo). Os éxons apresentaram códon inicial ATG e códon de parada TAA. O íntron apresentou sítios dinucleotídicos inicial (GT) e final (AG) característicos.

O relacionamento filogenético de *Gyrodactylus*, baseado nas sequências de ZMP (Fig. 9), de acordo com análise bayesiana, mostrou suporte para clados de espécies de parasitos, que coincidiram com a prévia identificação morfológica. Além disso, a topologia resultante forneceu suporte para linhagens de *Gyrodactylus* n.sp. 3 que refletiram a distribuição geográfica das suprapopulações (Fig. 9).

Na análise de variabilidade interespecífica, as sequências de ZMP de *Gyrodactylus* spp. apresentaram 104 sítios polimórficos (éxon + íntron). Entre as espécies, foram constatados 36 sítios polimórficos na região dos éxons (17 substituições sinônimas, 16 substituições não sinônimas e três “indels”) e 68 sítios polimórficos na região do íntron (38 mutações e 31

“indels”). Na análise de variabilidade intraespecífica dos éxons, *Gyrodactylus* n.sp. 1 apresentou 10 sítios polimórficos e 10 mutações (duas substituições sinônimas e oito não sinônimas); *Gyrodactylus* n.sp. 2 apresentou quatro sítios polimórficos e quatro mutações (duas substituições sinônimas e duas não sinônimas); *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá não apresentou mutações; e *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou oito sítios polimórficos e oito mutações (quatro substituições sinônimas e três não sinônimas). Na região do íntron, *Gyrodactylus* n.sp. 1 não apresentou mutações; *Gyrodactylus* n.sp. 2 apresentou três sítios polimórficos (três mutações); *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá apresentou dois sítios polimórficos (duas mutações); e *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou um sítio polimórfico (uma mutação). O número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 1 foi de 0,58; entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 2 foi de 1,64; entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá foi de 0,22; e entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara foi de 1,77.

Surpreendentemente, a variabilidade genética intraespecífica dos éxons foi maior do que aquela observada para o íntron. O teste-Z de seleção neutra mostrou diferenças significativas nas taxas de substituição sinônima e não sinônima de ZMP entre espécies e suprapopulações de *Gyrodactylus*, sugerindo que as mutações em ZMP estão sob seleção natural.

Foram obtidas 80 sequências do gene COII, das quais 11 são de *Gyrodactylus* n.sp. 1, 20 de *Gyrodactylus* n.sp. 2, 45 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 (sendo 18 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá e 27 de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara) e quatro de *Gyrodactylus* n.sp. 4 (sendo uma de *Gyrodactylus* n.sp. 4 da sub-bacia da baía de Paranaguá e três de *Gyrodactylus* n.sp. 4 da sub-bacia do rio Nhundiaquara). Os fragmentos de COII variaram de tamanho entre espécies e populações de parasitos: em *Gyrodactylus* n.sp. 1 e *Gyrodactylus* n.sp. 2, 564 pb; em *Gyrodactylus* n.sp. 3, 564 pb e 576 pb (em ambas as sub-bacias); e em *Gyrodactylus* n.sp. 4, 564 pb (espécime da baía de Paranaguá) e 570 pb (espécimes da sub-bacia

do rio Nhundiaquara). As sequências de COII apresentaram códon inicial alternativo TTG, o que representa um resultado inédito para *Gyrodactylus*, e códon de parada TAA ou TAG. O códon de parada TAG foi detectado apenas em sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 3 com tamanho de fragmento de 576 pb.

O relacionamento filogenético baseado nas sequências de COII (Fig. 10), de acordo com análise bayesiana, forneceu suporte para clados de espécies de parasitos, que coincidiram com a prévia identificação morfológica. Além disso, a topologia resultante forneceu suporte para linhagens de *Gyrodactylus* n.sp. 3 que refletiram a distribuição geográfica das suprapopulações (Fig. 10). Foram detectados oito haplótipos (H5–H12) de COII em *Gyrodactylus* n.sp. 1; 11 haplótipos (H13–H23) em *Gyrodactylus* n.sp. 2; 15 haplótipos em *Gyrodactylus* n.sp. 3, sendo três haplótipos (H24–H26) exclusivos da sub-bacia da baía de Paranaguá e 12 haplótipos (H27–H38) exclusivos da sub-bacia do rio Nhundiaquara; e quatro haplótipos em *Gyrodactylus* n.sp. 4, sendo um haplótipo (H1) exclusivo da sub-bacia da baía de Paranaguá e três haplótipos (H2–H4) exclusivos da sub-bacia do rio Nhundiaquara (Fig. 10). A divergência nucleotídica de COII entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de sub-bacias distintas foi de 4,1%, ao passo que a divergência nucleotídica entre suprapopulações da mesma sub-bacia foi de 0,2%. A análise concatenada dos genes ZMP e COII, inferida por análise bayesiana, revelou uma topologia muito semelhante àquela obtida com sequências de ZMP. Por essa razão, o resultado dessa análise concatenada não foi mostrado aqui.

Na análise de variabilidade interespecífica, as sequências de COII das espécies de *Gyrodactylus* apresentaram 242 sítios polimórficos, sendo 226 sítios com mutações (109 substituições sinônimas, 54 substituições não sinônimas e 16 códons complexos – com ambos tipos de substituição) e 16 sítios com “indels”. Na análise de variabilidade intraespecífica, *Gyrodactylus* n.sp. 1 apresentou 10 sítios polimórficos e 10 mutações (três substituições sinônimas e sete não sinônimas); *Gyrodactylus* n.sp. 2 apresentou 11 sítios polimórficos e 11 mutações (sete substituições sinônimas e quatro não sinônimas); *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-

bacia da baía de Paranaguá apresentou 19 sítios polimórficos, sendo sete sítios com substituições, sete mutações (quatro substituições sinônimas e duas não sinônimas) e 12 sítios com “indels”; *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara apresentou 27 sítios polimórficos, sendo 16 sítios com substituições, 16 mutações (sete substituições sinônimas e nove não sinônimas) e 12 sítios com “indels”; e *Gyrodactylus* n.sp. 4 apresentou 30 sítios polimórficos, sendo 24 sítios com substituições, 24 mutações (oito substituições sinônimas e 12 não sinônimas) e seis sítios com “indels”. O número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 1 foi de 3,78; entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 2 foi de 2,56; entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá foi de 2,29; entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara foi de 2,73; e entre sequências de *Gyrodactylus* n.sp. 4 foi de 13,17.

A reconstrução filogenética baseada nas sequências de aminoácidos de COII revelou uma topologia (Fig. 11) semelhante a da análise de nucleotídeos e suporte para clados de espécies de *Gyrodactylus*. O teste-Z de seleção neutra mostrou diferenças significativas nas taxas de substituição sinônima e não sinônima de COII entre espécies e suprapopulações de *Gyrodactylus* (Tabela 18), sugerindo que as mutações em COII estão sob seleção natural.

A reconstrução das datas de divergência (TMRCA) para as espécies de *Gyrodactylus*, inferida com o programa BEAST 1.6 com base nas sequências de COII (Fig. 10), sugere que o ancestral comum mais recente das quatro espécies de *Gyrodactylus* divergiu há, aproximadamente, 1,6 Ma (95% HPD = 1,28–2,01 Ma) em dois clados basais: um clado composto por *Gyrodactylus* n.sp. 1 + *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3, e outro clado composto exclusivamente por *Gyrodactylus* n.sp. 4. A divergência entre *Gyrodactylus* n.sp. 3 e o clado composto por *Gyrodactylus* n.sp. 1 + *Gyrodactylus* n.sp. 2 ocorreu há, aproximadamente, 1,34 Ma (95% HPD = 1,05–1,67 Ma). A divergência entre *Gyrodactylus* n.sp. 1 e *Gyrodactylus* n.sp. 2 ocorreu mais recentemente há, aproximadamente, 1,03 Ma (95% HPD = 0,76–1,33 Ma). O TMRCA para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 1 foi estimado em 43.000 anos (95% HPD

= 20.000–70.000 anos); para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 2 estimado em 47.000 anos (95% HPD = 20.000–80.000 anos); para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 3 estimado em 160.000 anos (95% HPD = 100.000–220.000 anos); e para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 4 estimado em 139.000 anos (95% HPD = 80.000–200.000 anos). O TMRCA para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá foi estimado em 48.000 anos (95% HPD = 19.000–78.000 anos) e para os haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara estimado em 46.000 anos (95% HPD = 22.000–70.000 anos).

O resultado da AMOVA sugeriu alta estruturação genética ( $F_{st} = 0,85$ ;  $P < 0,001$ ) entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de sub-bacias distintas. A porcentagem de variação genética entre suprapopulações de diferentes sub-bacias (85%) foi maior do que a variação intrapopulacional (15%). A AMOVA também sugeriu alta estruturação genética ( $F_{st} = 0,83$ ;  $P < 0,001$ ) entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 de rios distintos (sem considerar a localidade das sub-bacias). A porcentagem de variação genética entre suprapopulações de diferentes rios (83%) foi maior do que a variação intrapopulacional (17%).

De acordo com o teste de Mantel, houve pouca correlação entre o grau de diferenciação morfológica e genética ( $r^2 = 0,05$ ;  $P < 0,001$ ) entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3, sugerindo que as diferenças morfológicas não resultaram simplesmente de variação neutra entre linhagens genéticas de parasitos. Por outro lado, o teste de Mantel mostrou correlação positiva significativa entre distância geográfica e variabilidade genética ( $r^2 = 0,94$ ;  $P < 0,001$ ) entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3.

A análise da história demográfica (Fig. 12) e valores do teste de neutralidade D de Tajima para *Gyrodactylus* n.sp. 1 ( $D = 0,46$ ;  $P > 0,05$ ), *Gyrodactylus* n.sp. 3 ( $D = 1,98$ ;  $P > 0,05$ ) e *Gyrodactylus* n.sp. 4 ( $D = 0,06$ ;  $P > 0,05$ ), com exceção de *Gyrodactylus* n.sp. 2 ( $D = -0,61$ ;  $P > 0,05$ ), indicam uma retração no tamanho efetivo populacional<sup>(2)</sup> dessas espécies. Porém, o teste de neutralidade realizado separadamente para suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-

---

<sup>(2)</sup> Tamanho efetivo populacional: número de indivíduos que contribuem para a variabilidade genética da população.

bacia da baía de Paranaguá ( $D = 0,43$ ;  $P > 0,05$ ) e da sub-bacia do rio Nhundiaquara ( $D = -1,39$ ;  $P > 0,05$ ) mostrou resultados distintos. Por outro lado, o teste de neutralidade realizado com base na taxa de substituições sinônimas (dS) e não sinônimas (dN) de COII revelou mutações genéticas sob seleção purificadora ( $dN < dS$ ;  $P < 0,01$ ) em *Gyrodactylus* n.sp. 3; para as outras espécies o teste não revelou resultados significativos. A reconstrução da história demográfica revelou um padrão semelhante entre espécies de *Gyrodactylus*: redução no tamanho efetivo populacional, seguida de expansão demográfica recente (há 5.000 anos) (Fig. 12). Essa expansão demográfica parece estar relacionada com um aumento nas taxas de mutações sinônimas e não sinônimas de COII, como revelou o teste de neutralidade D de Tajima para dN/dS de *Gyrodactylus* n.sp. 1 ( $D = -0,18$ ), *Gyrodactylus* n.sp. 2 ( $D = -0,10$ ), *Gyrodactylus* n.sp. 3 ( $D = -0,21$ ) e *Gyrodactylus* n.sp. 4 ( $D = -2,72$ ).

A análise comparativa da história demográfica de parasitos e hospedeiros revelou incongruências entre a flutuação demográfica de espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* durante a última Era Glacial (entre 10.000–125.000 anos atrás) (Fig. 13). Por outro lado, as populações de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* compartilharam um evento de expansão demográfica recente que ocorreu há, aproximadamente, 5.000 anos (Fig. 13).

### 3.3.3. Associação parasito-hospedeiro

A análise da associação entre *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp., inferida com o programa Mesquite 2.7.4, revelou espécies parasitas com alta especificidade ao hospedeiro e eventos casuais de troca de hospedeiro (Fig. 14). A otimização mais parcimoniosa dos hospedeiros *S. barbatus* e *S. macropterus* sobre o cladograma da análise bayesiana de COII resultou em quatro eventos de dispersão (i.e. troca de hospedeiro) (Fig. 14). Esse número de eventos de dispersão foi significativamente diferente ( $P < 0,001$ ) do número de eventos esperados se a distribuição das espécies de *Gyrodactylus* entre *S. barbatus* e *S. macropterus* fosse aleatória (veja a distribuição das frequências na Fig. 15). *Gyrodactylus* n.sp. 1 e

*Gyrodactylus* n.sp. 2 aparecem quase que exclusivamente associadas à *S. macropterus*, com exceção de alguns poucos espécimes ( $n = 3$ ) coletados em *S. barbatus*. *Gyrodactylus* n.sp. 3 aparece quase que exclusivamente associada à *S. barbatus*, com exceção de alguns poucos espécimes ( $n = 3$ ) coletados em *S. macropterus*. *Gyrodactylus* n.sp. 4 apareceu associada somente à *S. barbatus*.

#### 4. Discussão

##### 4.1. Associação parasito-hospedeiro e adaptação morfológica em parasitos

A análise da associação parasito-hospedeiro revelou alta especificidade de *Gyrodactylus* spp. por *Scleromystax* spp. e eventos casuais de troca de hospedeiro. Os resultados sugerem que diferenças locais na associação parasito-hospedeiro estão mais relacionadas com a presença de um hospedeiro alternativo (i.e. possibilidade de troca de hospedeiro) do que com o isolamento geográfico das populações, o que rejeita a hipótese (i) desse estudo. Embora a troca de hospedeiro seja um evento comum entre *Gyrodactylus* spp. (Ziętara e Lumme, 2002; Boeger et al., 2003; Huyse et al., 2003; Meinilä et al., 2004; Bueno-Silva et al., 2011), constatou-se que *Gyrodactylus* n.sp. 1 e *Gyrodactylus* n.sp. 2 demonstraram alta especificidade à *S. macropterus*, independentemente da presença de *S. barbatus*. Com base em outros estudos com *Gyrodactylus* spp. (Desdevise et al., 2002; Boeger et al., 2003; Fallon et al., 2003, Bueno-Silva et al., 2011), acredita-se que a ocorrência de alguns poucos espécimes de *Gyrodactylus* n.sp. 1 e *Gyrodactylus* n.sp. 2 em *S. barbatus* pode estar relacionada a uma transferência casual de parasitos entre hospedeiros simpátricos distintos. Espécies de Callichthyidae geralmente apresentam comportamento social e agrupam-se em cardumes (obs. pes.; Paxton, 1997; Kaatz e Lobel, 1999; Breeland, 2007 – tese, Texas Tech University), o que pode facilitar a transmissão de parasitos entre hospedeiros distintos. Por outro lado, populações de *S. barbatus* que não ocorreram em

simpatria com *S. macropterus*, abrigaram exclusivamente espécimes de *Gyrodactylus* n.sp. 3 e *Gyrodactylus* n.sp. 4, independentemente da localização geográfica das populações. Esses resultados corroboram as observações de Bakke et al. (2002, 2007), de que algumas espécies de *Gyrodactylus* podem exibir alta especificidade ao hospedeiro, mesmo quando os parasitos têm a oportunidade de explorar outras espécies de hospedeiro em simpatria. Esses resultados evidenciam ainda que a associação *Gyrodactylus-Scleromystax* é definida por uma combinação de fatores históricos (e.g. especificidade ao hospedeiro) e ecológicos (e.g. oportunidade de troca de hospedeiro).

A análise de cluster das características morfométricas de estruturas esclerotizadas do háptor (i.e. âncoras e ganchos) revelou uma similaridade morfológica entre *Gyrodactylus* spp. parasitando a mesma espécie hospedeira. Esse resultado mostrou que a especificidade ao hospedeiro refletiu na adaptação morfológica de âncoras e ganchos de *Gyrodactylus* spp. entre espécies distintas de *Scleromystax*, o que confirma a correlação existente entre a variabilidade morfológica de estruturas esclerotizadas do háptor e especificidade ao hospedeiro em espécies de Monogenoidea (Malmberg, 1970; Mariniello et al., 2004; Kaci-Chaouch et al., 2008; Olstad et al., 2009; Poisot e Desdevises, 2010; Bueno-Silva et al., 2011).

#### 4.2. Variabilidade genética parasito-hospedeiro: estruturação geográfica, codivergência adaptativa e demografia histórica

A análise filogenética dos hospedeiros, baseada nos marcadores moleculares SRP54 e D-loop, reconheceu clados de *Scleromystax* associados às espécies *S. barbatus* e *S. macropterus* e à distribuição geográfica de populações de *S. barbatus*, o que confirma a hipótese (iii) desse estudo. No entanto, a baixa estruturação genética observada entre populações de *S. barbatus* de sub-bacias distintas pode estar relacionada com fatores históricos e ambientais que alteraram a estrutura e a diversidade genética das populações (Montoya-Burgos, 2003; Comesaña et al.,



2008; Rodrigues et al., 2008; von der Heyden et al. 2010). Porém, a região D-loop apresenta alta variação em sua taxa evolutiva (0,93–100% por Ma) entre diversos grupos de peixes (Montoya-Burgos, 2003; Liu et al., 2006) e, por esse motivo, é necessário ter cautela ao interpretar dados que sugerem pouca ou nenhuma estruturação genética entre populações geograficamente isoladas (sensu von der Heyden et al., 2010). No caso de *S. barbatus*, em que populações de sub-bacias distintas estão separadas por uma barreira geográfica (e.g. Serra da Prata) a uma distância média de 32 km, a baixa divergência genética entre as populações (0,7%) pode estar relacionada com eventos recentes de expansão demográfica e/ou gargalo genético (Zhang et al., 2006; Rodrigues et al., 2008).

Eventos de expansão demográfica recente (~ 250.000 anos) observados em populações de *S. barbatus* e *S. macropterus*, sugerem que um aumento simultâneo no tamanho efetivo populacional dessas espécies está relacionado com fatores ambientais (e.g. alterações climáticas ou geológicas) daquela época. Alguns estudos têm sugerido que mudanças climáticas drásticas durante o Pleistoceno (época entre 10.000 e 1.800.000 anos atrás) podem ter exercido forte influência na distribuição e flutuação demográfica de espécies de peixes em várias regiões do mundo (Hewitt, 2000; Lecomte et al., 2004; Liu et al., 2006). De acordo com Suguió et al. (1985), introgressões marinhas ocorridas durante o Período Quaternário (entre o Pleistoceno e Holoceno) desempenharam um papel importante na formação da costa litorânea da América do Sul. Ribeiro (2006) também destacou que as introgressões marinhas contribuíram para a dispersão de diversas espécies de peixes entre diferentes regiões da costa litorânea brasileira. Como *S. barbatus* e *S. macropterus* são encontrados exclusivamente em rios costeiros da planície litorânea do sudeste e sul do Brasil (Reis, 2003), é possível que populações de ambas as espécies estivessem sob influência de flutuações do nível do mar durante o Quaternário (sensu Hewitt, 2000). Com base nos dados de Dawson (1992) e Hewitt (2000), foi possível constatar que o padrão comum de expansão populacional de *S. barbatus* e *S. macropterus* corresponde a

um período interglacial (130.000–250.000 anos), entre o final do Pleistoceno e início do Holoceno, que pode ter possibilitado a dispersão das espécies e a ocupação de novos ambientes.

A reconstrução das datas de divergência dos haplótipos de *S. macropterus* e *S. barbatus* confirma o resultado acima a respeito da recente expansão populacional das espécies hospedeiras. Embora ambas as espécies tenham divergido há pouco mais de 6 Ma (entre o final do Mioceno e início do Plioceno), os haplótipos de *S. barbatus* e *S. macropterus* divergiram mais recentemente, há pouco menos de 1 Ma (no início do Pleistoceno). Eventos de gargalo genético ou efeito fundador, que antecederam a recente expansão demográfica de *S. barbatus* e *S. macropterus*, parecem estar relacionados com um período de glaciação (há mais de 250.000 anos), no final do Pleistoceno (Dawson, 1992; Hewitt, 2000), quando possivelmente essas espécies experimentaram uma redução em seu tamanho efetivo populacional.

Embora a AMOVA tenha mostrado baixa estruturação genética entre populações de *S. barbatus* de sub-bacias distintas, a análise da estrutura secundária de D-loop e da distribuição dos haplótipos sugerem o contrário. A análise da estrutura secundária de D-loop mostrou que populações originárias da mesma sub-bacia apresentam uma conformação estrutural mais semelhante entre si em comparação com populações de outra sub-bacia. Esse resultado revelou a importância da análise da estrutura secundária de D-loop (sensu Rocha-Olivares et al., 2005) como uma ferramenta complementar na diferenciação de populações geograficamente distantes. As diferenças observadas na estrutura secundária foram resultantes de variações no tamanho do fragmento de D-loop, devido a (i) inserções/deleções na sequência de DNA e (ii) a presença de fragmentos repetidos em tandem. Essa diferença de tamanho nos fragmentos de D-loop, conhecida como heteroplasmia, têm sido amplamente observada em várias espécies de peixes (Árnason e Rand, 1992; Faber e Stepien, 1998; Nesbø et al., 1998; Brzuzan, 2000; Ludwig et al., 2000; Hoarau et al., 2002; Chen et al., 2004; Ponce et al., 2008; Shui et al., 2008). Embora a região D-loop seja responsável por controlar a replicação e transcrição do mtDNA, possíveis variações no tamanho de fragmento, geralmente atribuídas a erros de replicação (Buroker et al.,

1990), são comumente observadas em D-loop de várias espécies de vertebrados (Moritz et al., 1987). Contudo, segundo Sbisà et al. (1997), a região D-loop está suscetível a tolerar eventos de deleção/inserção no DNA sem necessariamente comprometer sua função como região controle do mtDNA. Da mesma forma, Lee et al. (1995) argumentaram que possíveis alterações na estrutura secundária de D-loop devem influenciar pouco na sua funcionalidade, já que os sítios de interação DNA-proteína (e.g. fatores de transcrição do DNA) geralmente se mantêm conservados entre espécies. O padrão de repetições em tandem em *S. barbatus* é consistente com as observações de Lee et al. (1995), de que existe uma pressão seletiva para manter as inserções/deleções na porção inicial (5') ou final (3') do D-loop, como um mecanismo de evitar modificações estruturais nos sítios de interação DNA-proteína, que estão localizados na porção central do D-loop.

A análise comparativa de fragmentos de D-loop de *S. barbatus* demonstrou que repetições em tandem podem ser muito úteis em inferência filogenética, permitindo até mesmo distinguir populações de áreas geográficas distintas, como demonstrou Faber e Stepien (1998) para populações de uma espécie de Perciformes. Os dados genéticos de D-loop de *Scleromystax* spp. corroboram as observações de Sbisà et al. (1997), de que deleções e inserções de diferentes tamanhos em D-loop tornam essa região suscetível a mecanismos de expansão de DNA, o que pode ser muito útil na compreensão da diversificação genética e distribuição geográfica de populações de peixes.

A análise filogenética dos parasitos, baseada nos marcadores moleculares ZMP e COII, permitiu reconhecer clados de parasitos associados às espécies de *Gyrodactylus* e à distribuição geográfica de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3, o que confirma a hipótese (iii) desse estudo. Diferentemente do resultado obtido para os hospedeiros, as suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 originárias de localidades distintas apresentaram elevado grau de estruturação genética. Essa divergência entre dados moleculares de hospedeiros e parasitos pode estar relacionada com algumas características biológicas de *Gyrodactylus* que contribuem para a

manutenção de altas taxas de diversificação genética, tais como hiperviviparidade, curto tempo de geração (~ 4 dias) e capacidade de dispersão durante toda fase da vida (Cable e Harris, 2002; Bakke et al., 2002, 2007; Boeger et al., 2003). Diferenças na história natural das espécies também poderiam explicar possíveis divergências na variabilidade genética entre parasitos e hospedeiros (Whiteman et al., 2007). No entanto, ao contrário do observado para os hospedeiros, houve uma correlação significativa entre a distância geográfica e a estruturação genética de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3.

A baixa diversidade genética de ZMP (2%) e ITS (3%) entre *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3, em comparação com as outras espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax*, poderia indicar (i) hibridização entre as duas espécies, ou (ii) que essas espécies descendem de uma linhagem ancestral comum que divergiu recentemente, como sugerido por Bueno-Silva (capítulo II). Os critérios usados por Ziętara e Lumme (2003) para distinguir espécies crípticas de *Gyrodactylus* foram aplicados aqui para analisar as duas hipóteses acima. De acordo com os autores, espécies de *Gyrodactylus* podem ser distinguidas com base em três critérios: (i) diferenças consistentes no DNA; (ii) diferenças consistentes na morfologia dos ganchos; e (iii) alta especificidade ao hospedeiro. Os dados morfométricos e moleculares de *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3 atendem satisfatoriamente aos critérios (ii) e (iii) e, de forma parcial, ao critério (i) de Ziętara e Lumme (2003). A baixa divergência genética de ZMP e ITS observada entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3 de sub-bacias distintas descarta, entretanto, a hipótese de hibridização entre as espécies. Diferenças interespecíficas na estrutura secundária de ITS2, principalmente na hélice III, confirmaram o status taxonômico das espécies de *Gyrodactylus* (Coleman et al., 2009). Considerando a taxa evolutiva de ITS (5,5% por Ma) inferida por Ziętara e Lumme (2002), os resultados sugerem, portanto, que *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3 descendem de uma linhagem ancestral comum que divergiu recentemente (há menos de 1 Ma) entre espécies distintas de *Scleromystax*, o que confirma a segunda hipótese acima. Esses dados são consistentes com um cenário de especiação

alopátrica em *Gyrodactylus*, no qual uma linhagem ancestral parasita pode ter colonizado e se adaptado a diferentes espécies hospedeiras (Brooks e McLennan, 1993; Huyse et al., 2005). Eventos de troca de hospedeiro podem ter contribuído para a adaptação de linhagens de *Gyrodactylus* entre hospedeiros distintos (Boeger et al., 2003; Meinilä et al., 2004; Bueno-Silva et al., 2011), resultando assim na especiação de *Gyrodactylus* n.sp. 2 e *Gyrodactylus* n.sp. 3 entre diferentes espécies de hospedeiros, *S. macropterus* e *S. barbatus*.

A reconstrução das datas de divergência dos parasitos revelou que as espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax* divergiram, aproximadamente, 4,5 milhões de anos depois das espécies hospedeiras, o que descarta a possibilidade de coespeciação parasito-hospedeiro. Por outro lado, as datas de divergência de haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 3 e *Gyrodactylus* n.sp. 4 de sub-bacias distintas (100.000–200.000 anos) sugerem que essas espécies compartilharam uma história biogeográfica comum. Haplótipos de *Gyrodactylus* n.sp. 3 e *Gyrodactylus* n.sp. 4 de sub-bacias distintas divergiram, simultaneamente, após à expansão demográfica da espécie hospedeira (*S. barbatus*), em um período interglacial durante o Pleistoceno (Dawson, 1992; Hewitt, 2000). Esse resultado mostrou que a divergência genética entre populações de hospedeiros e parasitos não está apenas sob efeito de processos de vicariância (e.g. surgimento de barreiras geográficas), mas também a fatores paleoclimáticos que, provavelmente, influenciaram na dispersão de populações entre áreas geográficas distintas.

A análise comparativa da história demográfica das populações revelou incongruências entre as flutuações demográficas de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*. Esse resultado mostrou que a história demográfica de parasitos e hospedeiros não é necessariamente congruente entre si, o que rejeita a hipótese (iv) desse estudo. Vários cenários poderiam explicar as incongruências entre a história demográfica recente das populações de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*: (i) uma recente associação parasito-hospedeiro, em que populações de parasitos estão inicialmente sujeitas a um estágio de maladaptação (e.g. período de adaptação ao hospedeiro) (Crespi, 2000; Thompson et al., 2002); (ii) um aumento na diversidade genética dos hospedeiros (e.g. expansão demográfica)

poderia favorecer a seleção de genótipos raros, aos quais os parasitos são insuficientemente adaptados, provocando uma desigualdade temporal na frequência genotípica de populações de parasitos (e.g. deriva genética) (Thompson et al., 2002); (iii) a reconstrução das datas de divergência (TMRCA) sugere que a associação entre espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* ocorreu durante um período de glaciação no Pleistoceno (11.000–130.000 anos) (Dawson, 1992; Hewitt, 2000), que poderia ter limitado a expansão demográfica de espécies de *Gyrodactylus* devido às condições climáticas daquela época. De todos esses, os cenários (ii) e (iii) parecem esclarecer melhor os resultados obtidos nesse estudo. O fato de diferentes espécies de *Gyrodactylus* terem experimentado uma expansão populacional simultânea (há 5.000 anos) sugere a influência de fatores ambientais na flutuação demográfica das espécies. Interessantemente, os dados mostraram que a expansão populacional das espécies de *Gyrodactylus* coincide com um período de intenso degelo durante o Holoceno (entre 5.000–7.000 anos atrás) e com a estabilização do nível do mar (Dawson, 1992). A análise comparativa da história demográfica de parasitos e hospedeiros sugere, dessa forma, que retrações e expansões populacionais em *Gyrodactylus* spp. e *Scleromystax* spp. estão associadas, respectivamente, com períodos glaciais e interglaciais (i.e. ciclos de glaciação e degelo a cada 100.000 anos) entre o final do Pleistoceno e parte do Holoceno (entre 5.000–250.000 anos atrás) (Imbrie et al., 1992; Petit et al., 1999; Glennon et al., 2008; Hickerson et al., 2010).

A expansão demográfica das suprapopulações de *Gyrodactylus* parece, ainda, refletir um aumento nas taxas de mutações sinônimas e não sinônimas em COII, sugerindo que a diversificação de *Gyrodactylus* está associada a eventos de codivergência adaptativa. Segundo Kita et al. (1997), helmintos parasitos exibem uma grande variedade de mecanismos para obtenção de energia metabólica (via citocromo oxidase), a qual desempenha um papel importante na adaptação da espécie parasita ao seu meio ambiente. Alguns autores têm demonstrado que eventos de cladogênese estão associados com uma elevada taxa evolutiva em citocromo oxidase (e.g. aumento no número de substituições não sinônimas) em diferentes

espécies de animais (Adkins et al., 1996; Blier et al., 2001; Rawson e Burton, 2002; Doan et al., 2004). Kita et al. (1997) comentaram que algumas mutações na sequência de aminoácidos de citocromo oxidase podem influenciar no grau de resistência do parasito a determinados agentes inibidores da cadeia respiratória celular. Embora não existam, até o presente momento, estudos sobre o efeito de mutações genéticas de citocromo oxidase em espécies de Monogenoidea, os dados de Rawson e Burton (2002) fornecem subsídios para compreender os resultados obtidos com espécies de *Gyrodactylus*. Rawson e Burton (2002) descobriram que algumas mutações na sequência de aminoácidos de citocromo oxidase foram suficientes para modificar a especificidade da proteína entre populações distintas de copépoda. Os resultados sugerem, portanto, que a alta diversidade genética de COII em *Gyrodactylus* reflete a coadaptação de espécies e linhagens parasitas entre hospedeiros e ambientes geográficos distintos, o que confirma a hipótese (ii) desse estudo.

#### 4.3. Variabilidade morfológica parasito-hospedeiro: variação fenotípica entre populações

A análise morfométrica dos hospedeiros revelou diferenças significativas entre populações de *S. barbatus* de rios e sub-bacias distintas. Esse resultado mostrou que a divergência morfológica entre populações de *Scleromystax* está associada ao habitat, o que confirma dados de outros estudos sobre o papel da estruturação geográfica na variabilidade morfológica de populações de peixes (Strauss, 1985; Robinson e Wilson, 1994; Smith e Skúlason, 1996; Langerhans et al., 2003; Shibatta e Hoffmann, 2005). Os dados obtidos por Shibatta e Hoffmann (2005), por exemplo, permitiram aos autores distinguir populações de *C. paleatus* de diferentes bacias hidrográficas do estado do Paraná com base na análise comparativa de características morfométricas. Embora exista uma base genética para a variabilidade morfológica em espécies de peixes (Robinson e Wilson, 1994; Smith e Skúlason, 1996), os resultados sugerem que fatores ambientais locais podem ter contribuído muito mais na variação fenotípica de populações de *S.*

*barbatus*, pois a variação morfométrica pareceu pouco relacionada com a distância geográfica e genética entre populações. De acordo com Langerhans et al. (2003), diferenças entre habitats (e.g. oportunidade de forrageamento, competição intraespecífica) podem criar pressões seletivas locais que resultam na diferenciação morfológica de populações coespecíficas. Os dados sugerem, deste modo, que a variabilidade morfométrica entre populações de *S. barbatus* pode resultar de padrões locais de crescimento (sensu Shibatta e Hoffmann, 2005), em função do isolamento geográfico das populações (e.g. pouco fluxo gênico entre populações) e de condições ambientais distintas.

O resultado da análise morfométrica dos parasitos revelou diferenças significativas entre âncoras e ganchos de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletadas em diferentes rios e sub-bacias. Contudo, as incongruências entre a topologia molecular e morfológica de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 sugerem a influência de outros fatores na variabilidade morfológica de estruturas esclerotizadas do háptor em *Gyrodactylus*. Esse resultado está em conformidade com outros estudos, os quais têm evidenciado que a plasticidade fenotípica em âncoras e ganchos de Monogenoidea está associada a fatores abióticos e/ou bióticos (Malmberg, 1970; Mo, 1991a, b; Rohde, 1991; Perera, 1992; De Meeûs et al., 1993; Harris, 1998; Geets et al., 1999; Dmitrieva e Dimitrov, 2002; Huyse e Volckaert, 2002; Dávidová et al., 2005; Robertsen et al., 2007; Bueno-Silva et al., 2011). Estudos recentes de Olstad et al. (2009) e Bueno-Silva et al. (2011), por exemplo, evidenciaram a influência da espécie hospedeira na variabilidade morfométrica de âncoras e ganchos de espécies de *Gyrodactylus*. Segundo os autores, a variabilidade morfométrica de estruturas esclerotizadas do háptor reflete a adaptação do parasito ao seu hospedeiro. Os resultados sugerem, portanto, que a variação morfométrica de âncoras e ganchos não está associada somente à variação genética e à distância geográfica entre suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3, mas sim a uma combinação de fatores ambientais e genéticos que podem definir padrões locais de crescimento, como também observado para os hospedeiros, o que confirma parcialmente a hipótese (iii) desse estudo.



Os dados morfológicos de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* podem, ainda, fornecer evidências para as observações de Agrawal (2001) e Thompson (2005), de que a variação morfométrica entre populações resulta da adaptação local parasito-hospedeiro (i.e. influência de fatores ambientais e diferenças espaciais ou temporais na associação parasito-hospedeiro). De acordo com Agrawal (2001), a evolução da plasticidade fenotípica adaptativa contribui potencialmente para a especiação e a diferenciação genética de populações.

## 5. Conclusões

*Hipótese (I): A associação parasito-hospedeiro varia entre populações geograficamente isoladas?*

Os resultados desse estudo mostraram que a estruturação geográfica é um fator determinante da diferenciação genética e morfológica de populações de *Gyrodactylus* e *Scleromystax*. Entretanto, os dados revelaram que possíveis diferenças locais na associação parasito-hospedeiro estão mais relacionadas com eventos de troca de hospedeiro do que com o isolamento geográfico das populações.

*Hipótese (II): O isolamento geográfico das populações reflete a codivergência adaptativa de linhagens de parasitos e seus hospedeiros?*

A análise da evolução molecular de COII e D-loop mostrou que a diversificação genética de populações de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax* foi dirigida essencialmente por seleção natural. No caso de *Gyrodactylus*, altas taxas de evolução molecular em COII podem estar relacionadas com características biológicas das espécies (e.g. hiperviviparidade e curto tempo de geração), que favorecem o rápido acúmulo de mutações no DNA. De acordo com Avise et al. (1987), genes mitocondriais responsáveis pela produção de energia metabólica (e.g. citocromos oxidase) podem apresentar mutações genéticas sob seleção natural. No caso de *S. barbatus*, as

diferenças genéticas em D-loop foram detectadas principalmente entre populações de sub-bacias distintas, o que evidenciou como o isolamento geográfico contribuiu para a estruturação genética das populações. Os resultados mostraram, portanto, que a diversificação genética observada entre populações de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax* reflete a codivergência adaptativa de COII e D-loop (i.e. coadaptação genética de parasitos e hospedeiros entre ambientes geográficos distintos).

*Hipótese (III): O grau de diferenciação genética e morfológica está relacionado ao isolamento geográfico das populações?*

Os resultados revelaram que o grau de diferenciação genética e morfológica em espécies de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax* está relacionado ao isolamento geográfico das populações. No entanto, a baixa correlação observada entre variação morfométrica e distância geográfica das populações, sugere que a diversificação morfológica de parasitos e hospedeiros também é determinada por fatores ambientais locais. Além disso, o conjunto de dados moleculares e morfométricos pode ainda fornecer evidências que contribuam para as hipóteses da teoria do mosaico geográfico de coevolução (Thompson, 1999, 2005). O padrão de variação genética e morfológica observado entre populações de *Scleromystax* e de *Gyrodactylus* é comparável ao de outros estudos, cujos resultados têm considerado a estruturação geográfica um fator determinante da adaptação local de populações de parasitos e hospedeiros (Kaltz e Shykoff, 1998; Althoff e Thompson, 1999; Gandon e Michalakis, 2002; Dybdahl e Storfer, 2003; Prugnolle et al., 2005; Sánchez, 2005; Nuismer, 2006; Johnson et al., 2007; Ruano et al., 2011). De acordo com Thompson (2005), a adaptação local é o ponto de partida da dinâmica coevolutiva em mosaico geográfico, pois à medida que as populações interagem mutuamente, pressões seletivas locais promovem, ao longo do tempo, a diversificação de populações de parasitos e hospedeiros.

*Hipótese (IV): A história demográfica das populações de parasitos é congruente com a de seus hospedeiros?*

Uma possível relação entre eventos de retração-expansão populacional e ciclos de glaciação-degelo no Período Quaternário, mostrou que as flutuações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno e Holoceno devem ter exercido forte influência na densidade demográfica de espécies de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax*. A atual distribuição geográfica de espécies de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax*, no litoral sul do Brasil, sugere que flutuações do nível do mar, ocorridas durante o Quaternário, também podem ter influenciado na distribuição das populações entre diferentes regiões da bacia litorânea do Paraná. Dados geomorfológicos das sub-bacias da baía de Paranaguá e do rio Nhundiaquara (Bigarella, 2001; Maack, 2001) sugerem que o isolamento geográfico entre populações de sub-bacias distintas deve ter ocorrido, pelo menos, no início do Pleistoceno (há aproximadamente 1.800.000 anos), quando iniciou o soerguimento de massa continental da bacia litorânea. Contudo, evidências genéticas associadas a dados paleoclimáticos sugerem que o isolamento geográfico entre populações de sub-bacias distintas ocorreu mais recentemente, após o soerguimento de possíveis barreiras geográficas (e.g. Serra da Prata), como resultado da influência de variações climáticas (e.g. ciclos de glaciação e degelo) e flutuações do nível do mar durante o Período Quaternário. Os resultados mostraram que a história demográfica dos parasitos não é necessariamente congruente com a de seus hospedeiros, pois fatores paleoclimáticos e históricos (e.g. associação parasito-hospedeiro) parecem ter influenciado, de forma distinta, na flutuação demográfica de *Gyrodactylus* e de *Scleromystax*.

## Referências

- Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D., 2005. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21, 2104-2105.
- Abascal, F., Zardoya, R., Telford, M.J., 2010. TranslatorX: multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* 38, 7-13.
- Adkins, R.M., Honeycutt, R.L., Disotell, T.R., 1996. Evolution of eutherian cytochrome c oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1393-1404.
- Agrawal, A.A., 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294, 321-326.
- Althoff, D.M., Thompson, J.N., 1999. Comparative geographic structures of two parasitoid-host interactions. *Evolution* 53, 818-825.
- Árnason, E., Rand, D.M., 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics* 132, 211-220.
- Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.
- Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., 2007. The biology of gyrodactylid monogeneans: the “Russian doll-killers”. *Adv. Parasitol.* 64, 161-376.
- Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.* 32, 281-308.
- Benson, G., 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27, 573-580.
- Bernhart, S.H., Hofacker, I.L., Will, S., Gruber, A.R., Stadler, P.F., 2008. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics* 9: 474.

- Bigarella, J.J., 2001. Contribuição ao estudo da planície litorânea do estado do Paraná. Braz. Arch. Biol. Technol. Jubilee volume (1946-2001), 65-110.
- Blier, P.U., Dufresne, F., Burton, R.S., 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. Trends Genet. 17, 400-406.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., 2003. Context of diversification of the viviparous Gyrodactylidae (Platyhelminthes, Monogeneoidea). Zool. Scr. 32, 437-448.
- Boeger, W.A., Kritsky, D.C., Pie, M.R., Engers, K.B., 2005. Mode of transmission, host switching, and escape from the Red Queen by viviparous gyrodactylids (Monogeneoidea). J. Parasitol. 91, 1000-1007.
- Boeger, W.A., Vianna, R.T., Thatcher, V.E., 2006. Monogeneoidea. In: J. Adis, J.R. Arias, G. Rueda-Delgado and K.M. Wantzen (Eds.), Aquatic Biodiversity in Latin America. Vol. 1. Amazon Fish Parasites. Second edition. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria, pp. 42-116.
- Bonnet, E., Van de Peer, Y., 2002. ZT: a software tool for simple and partial Mantel tests. J. Stat. Softw. 7, 1-12.
- Brooks, D.R., McLennan, D.A., 1993. Parascript: parasites and the language of evolution. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Brzuzan, P., 2000. Tandemly repeated sequences in mtDNA control region of whitefish, *Coregonus lavaretus*. Genome 43, 584-587.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A., 2009. Neotropical Monogeneoidea. 53. *Gyrodactylus corydori* sp. n. and redescription of *Gyrodactylus anisopharynx* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae), parasites of *Corydoras* spp. (Siluriformes: Callichthyidae) from southern Brazil. Folia Parasitol. 56, 13-20.
- Bueno-Silva, M., Boeger, W.A., Pie, M.R., 2011. Choice matters: Incipient speciation in *Gyrodactylus corydori* (Monogeneoidea: Gyrodactylidae). Int. J. Parasitol. 41, 657-667.

- Buroker, N.E., Brown, J.R., Gilbert, T.A., O'Hara, P.J., Beckenbach, A.T., Thomas, W.K., Smith, M.J., 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* 124, 157-163.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83, 575-583.
- Cable, J., Harris, P.D., 2002. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *Int. J. Parasitol.* 32, 255-280.
- Cable, J., van Oosterhout, C., Barson, N., Harris, P.D., 2005. *Gyrodactylus pictae* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from the Trinidadian swamp guppy *Poecilia picta* Regan, with a discussion on species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 and their poeciliid hosts. *Syst. Parasitol.* 60, 159-164.
- Chen, C.A., Ablan, M.C.A., McManus, J.W., Bell, J.D., Tuan, V.S., Cabanban, A.S., Shao, Kwang-Tsao, 2004. Variable numbers of tandem repeats (VNTRs), heteroplasmy, and sequence variation of the mitochondrial control region in the threespot *Dascyllus*, *Dascyllus trimaculatus* (Perciformes: Pomacentridae). *Zool. Stud.* 43, 803-812.
- Cohen, S.C., Kohn, A., 2008. South American Monogenea – list of species, hosts and geographical distribution from 1997 to 2008. *Zootaxa* 1924, 1-42.
- Coleman, A.W., 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50, 197-203.
- Comesaña, A.S., Martínez-Areal, M.T., Sanjuan, A., 2008. Genetic variation in the mitochondrial DNA control region among horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the Atlantic and Mediterranean areas. *Fish. Res.* 89, 122-131.
- Crespi, B.J., 2000. The evolution of maladaptation. *Heredity* 84, 623-629.
- Cunningham, C.O., Mo, T.A., 1997. Random amplified polymorphic (RAPD) analysis of three Norwegian *Gyrodactylus salaris* populations (Monogenea; Gyrodactylidae). *J. Parasitol.* 83, 311-314.

- Dávidová, M., Jarkovský, J., Matejusová, I., Gelnar, M., 2005. Seasonal occurrence and metrical variability of *Gyrodactylus rhodei* Žitnan 1964 (Monogenea, Gyrodactylidae). Parasitol. Res. 95, 398-405.
- Dawson, A.G., 1992. Ice Age Earth: Late Quaternary geology and climate. Routledge, London.
- De Meeûs, T., Michalakis, Y., Renaud, F., Olivieri, I., 1993. Polymorphism in heterogenous environments, evolution of habitat selection and sympatric speciation: soft and hard selection models. Evol. Ecol. 7, 175-198.
- Desdevises, Y., Morand, S., Jousson, O., Legendre, P., 2002. Coevolution between *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) and Sparidae (Teleostei): the study of a complex host-parasite system. Evolution 56, 2459-2471.
- Dmitrieva, E., Dimitrov, G., 2002. Variability in the taxonomic characters of Black Sea gyrodactylids (Monogenea). Syst. Parasitol. 51, 199-206.
- Doan, J.W., Schmidt, T.R., Wildman, D.E., Uddin, M., Goldberg, A., Hüttemann, M., Goodman, M., Weiss, M.L., Grossman, L.I., 2004. Coadaptive evolution in cytochrome c oxidase: 9 of 13 subunits show accelerated rates of nonsynonymous substitution in anthropoid primates. Mol Phylogenet Evol. 33, 944-950.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7, 214.
- Dybdahl, M.F., Storfer, A., 2003. Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. Trends Ecol. Evol. 18, 523-530.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792-1797.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. 10, 564-567.

- Faber, J.E., Stepien, C.A., 1998. Tandemly repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the Pike-Perches *Stizostedion*. Mol. Phylogenet. Evol. 10, 310-322.
- Fallon, S.M., Bermingham, E., Ricklefs, R.E., 2003. Island and taxon effects in parasitism revisited: avian malaria in the Lesser Antilles. Evolution 57, 606-615.
- Gandon, S., Michalakis, Y., 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. J. Evol. Biol. 15, 451-462.
- Geets, A., Appleby, C., Ollevier, F., 1999. Host-dependent and seasonal variation in opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus* cf. *arcuatus* from three *Pomatoschistus* spp. and *G. arcuatus* from *Gasterosteus aculeatus*: a multivariate approach. Parasitology 119, 27-40.
- Glennon, V., Perkins, E.M., Chisholm, L.A., Whittington, I.D., 2008. Comparative phylogeography reveals host generalists, specialists and cryptic diversity: Hexabothriid, microbothriid and monocotylid monogeneans from rhinobatid rays in southern Australia. Int. J. Parasitol. 38, 1599-1612.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41, 95-98.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electronica 4, 1-9.
- Hansen, H., Bachmann, L., Bakke, T.A., 2003. Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. Int. J. Parasitol. 33, 1471-1478.
- Harris, P.D., 1998. Extreme morphological variation between related individuals of *Gyrodactylus pungitti* Malmberg, 1964 (Monogenea). Syst. Parasitol. 39, 137-140.
- Hewitt, G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405, 907-913.



- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., Yoder, A.D., 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 291-301.
- Hoarau, G., Holla, S., Lescasse, R., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2261-2264.
- Hofacker, I.L., 2003. Vienna RNA secondary structure server. *Nucl. Acids Res.* 31, 3429-3431.
- Huyse, T., Audenaert, V., Volckaert, F.A.M., 2003. Speciation and host-parasite relationships in the genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Platyhelminthes) infecting gobies of the genus *Pomatoschistus* (Gobiidae, Teleostei). *Int. J. Parasitol.* 33, 1679-1689.
- Huyse, T., Poulin, R., Théron, A., 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol.* 21, 469-475.
- Huyse, T., Volckaert, F.A.M., 2002. Identification of a host-associated species complex using molecular and morphometric analyses, with description of *Gyrodactylus rugiensoides* n.sp. (Gyrodactylidae, Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 32, 907-919.
- Huyse, T., Volckaert, F.A.M., 2005. Comparing host and parasite phylogenies: *Gyrodactylus* flatworms jumping from Goby to Goby. *Syst. Biol.* 54, 710-718.
- Imbrie, J., Boyle, E.A., Clemens, S.C., Duffy, A., Howard, W.R., Kukla, G., Kutzbach, J., Martinson, D.G., McIntyre, A., Mix, A.C., Molfino, B., Morley, J.J., Peterson, L.C., Pisias, N.G., Prell, W.L., Raytoo, M.E., Shackleton, N.J., Toggweiler, J.R., 1992. On the structure and origin of major glaciation cycles. 1. Linear responses to Milankovitch forcing. *Paleoceanography* 7, 701-738.
- Jarman, S.N., Ward, R.D., Elliott, N.G., 2002. Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. *Mar. Biotechnol.* 4, 347-355.
- Johnson, S.G., Hulsey, C.D., García de Leon, F.J., 2007. Spatial mosaic evolution of snail defensive traits. *BMC Evol. Biol.* 7, 50.

- Kaatz, I.M., Lobel, P.S., 1999. Acoustic behavior and reproduction in five species of *Corydoras* catfishes (Callichthyidae). Biol. Bull. 197, 241-242.
- Kaci-Chaouch, T., Verneau, O., Desdevises, Y., 2008. Host specificity is linked to intraspecific variability in the genus *Lamellodiscus* (Monogenea). Parasitology 135, 607-616.
- Kaltz, O., Shykoff, J.A., 1998. Local adaptation in host-parasite systems. Heredity 81, 361-370.
- Kita, K., Hirawake, H., Takamiya, S., 1997. Cytochromes in the respiratory chain of helminth mitochondria. Int. J. Parasitol. 27, 617-630.
- Kritsky, D.C., Vianna, R.T., Boeger, W.A., 2007. Neotropical Monogenoidea. 50. Oviparous gyrodactylids from loricariid and pimelodid catfishes in Brazil, with proposal of *Phanerothecioides* n. gen., *Onychogyrodactylus* n. gen. and *Agelaiogyrodactylus* n. gen. (Polyonchoinea, Gyrodactylidae). Syst. Parasitol. 66, 1-34.
- Langerhans, R.B., Layman, C.A., Langerhans, A.K., Dewitt, T.J., 2003. Habitat-associated morphological divergence in two Neotropical fish species. Biol. J. Linn. Soc. 80, 689-698.
- LeBlanc, J., Hansen, H., Burt, M., Cone, D., 2006. *Gyrodactylus neili* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae), a parasite of chain pickerel *Esox niger* Lesueur (Esocidae) from freshwaters of New Brunswick, Canada. Syst. Parasitol. 65, 43-48.
- Lecomte, F., Grant, W.S., Dodson, J.J., Rodríguez-Sánchez, R., Bowen, B.W., 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). Mol. Ecol. 13, 2169-2182.
- Lee, Woo-Jai, Conroy, J., Howell, W.H., Kocher, T.D., 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. J. Mol. Evol. 41, 54-66.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25, 1451-1452.
- Liu, Jin-Xian, Gao, Tian-Xiang, Yokogawa, K., Zhang, Ya-Ping, 2006. Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass

- (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific. Mol. Phylogenet. Evol. 39, 799-811.
- Ludwig, A., May, B., Debus, L., Jenneckens, I., 2000. Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). Genetics 156, 1933-1947.
- Maack, R., 2001. Breves Notícias Sobre a Geologia dos Estados do Paraná e Santa Catarina. Braz. Arch. Biol. Technol. Jubilee volume (1946-2001), 169-288.
- Maddison, W.P., 1995. Calculating the probability distributions of ancestral states reconstructed by parsimony on phylogenetic trees. Syst. Biol. 44, 474-481.
- Malmberg, G., 1970. The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematic of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). Ark. Zool. 23, 1-235.
- Mariniello, L., Ortis, M., D'Amelio, S., Petrarca, V., 2004. Morphometric variability between and within species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) in the Mediterranean Sea. Syst. Parasitol. 57, 183-190.
- Matejusová, I., Gelnar, M., McBeath, A.J.A., Collins, C.M., Cunningham, C.O., 2001. Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). Int. J. Parasitol. 31, 738-745.
- McVicar, A.H., 1997. Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. J. Mar. Sci. 54, 1093-1103.
- Meinilä, M., Kuusela, J., Ziętara, M., Lumme, J., 2002. Primers for amplifying ~ 820 bp highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. Hereditas 137, 72-74.
- Meinilä, M., Kuusela, J., Ziętara, M.S., Lumme, J., 2004. Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). Int. J. Parasitol. 34, 515-526.
- Mo, T.A., 1991a. Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. Syst. Parasitol. 20, 11-19.

- Mo, T.A., 1991b. Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. Syst. Parasitol. 20, 1-9.
- Montoya-Burgos, J.I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. Mol. Ecol. 12, 1855-1867.
- Morand, S., Simková, A., Matejusová, I., Plaisance, L., Verneau, O., Desdevises, Y., 2002. Investigating patterns may reveal processes: evolutionary ecology of ectoparasitic monogeneans. Int. J. Parasitol. 32, 111-119.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18, 269-292.
- Nesbø, C.L., Arab, M.O., Jakobsen, K.S., 1998. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). Genetics 148, 1907-1919.
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., Michaux, J.R., 2004. A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. Proc. R. Soc. Lond. B 271, 2559-2568.
- Nuismer, S.L., 2006. Parasite local adaptation in a geographic mosaic. Evolution 60, 24-30.
- Olstad, K., Bachmann, L., Bakke, T.A., 2009. Phenotypic plasticity of taxonomic and diagnostic structures in gyrodactylosis-causing flatworms (Monogenea, Platyhelminthes). Parasitology 136, 1305-1315.
- Page, R.D.M., Charleston, M.A., 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. Tree 13, 356-359.
- Paxton, C.G.M., 1997. Shoaling and activity levels in *Corydoras*. J. Fish Biol. 51, 469-502.

- Perera, K.M.L., 1992. The effect of host size on large hamuli length of *Kuhnia scombri* (Monogenea: Polyopisthocotylea) from Eden, New South Wales, Australia. *Int. J. Parasitol.* 22, 123-124.
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.-M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davisk, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V.M., Legrand, M., Lipenkov, V.Y., Lorius, C., Pépin, L., Ritz, C., Saltzmank, E., Stievenard, M., 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399, 429-436.
- Poisot, T., Desdevises, Y., 2010. Putative speciation events in *Lamellodiscus* (Monogenea: Diplectanidae) assessed by a morphometric approach. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 99, 559-569.
- Ponce, M., Infante, C., Jiménez-Cantizano, R.M., Pérez, L., Manchado, M., 2008. Complete mitochondrial genome of the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Perciformes: Sparidae), with high levels of length heteroplasmy in the WANCY region. *Gene* 409, 44-52.
- Popazoglo, F., Boeger, W.A., 2000. Neotropical Monogenoidea 37. Redescription of *Gyrodactylus superbus* (Szidat, 1973) comb. n. and description of two new species of *Gyrodactylus* (Gyrodactylidea: Gyrodactylidae) from *Corydoras paleatus* and *C. ehrhardti* (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) of southern Brazil. *Folia Parasitol.* 47, 105-110.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253-1256.
- Poulin, R., Morand, S., 1999. Geographical distances and the similarity among parasite communities of conspecific host populations. *Parasitology* 119, 369-374.
- Prugnolle, F., Theron, A., Pointier, J.P., Jabbour-Zahab, R., Jarne, P., Durand, P., de Meeûs, T., 2005. Dispersal in a parasitic worm and its two hosts: consequence for local adaptation. *Evolution* 59, 296-303.
- Ramírez-Macías, D., Vázquez-Juárez, R., Galván-Magaña, F., Munguía-Vega, A., 2007. Variations of the mitochondrial control region sequence in whale sharks (*Rhincodon typus*) from the Gulf of California, Mexico. *Fish. Res.* 84, 87-95.

- Rawson, P.D., Burton, R.S., 2002. Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12955-12958.
- Reis, R.E., 2003. Family Callichthyidae. In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J., Jr. (Eds.), *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 291–309.
- Ribeiro, A.C., 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. Ichthyol.* 4, 225-246.
- Robertsen, G., Hansen, H., Bachmann, L., Bakke, T.A., 2007. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) in Norway. *Parasitology* 134, 257-267.
- Robinson, B.W., Wilson, D.S., 1994. Character release and displacement in fishes: a neglected literature. *Am. Nat.* 144, 596-627.
- Rocha-Olivares, A., Garber, N.M., Garber, A.F., Stuck, K.C., 2005. Structure of the mitochondrial control region and flanking tRNA genes of *Mugil cephalus*. *Hidrobiológica* 15, 139-149.
- Rodrigues, R., Schneider, H., Santos, S., Vallinoto, M., Sain-Paul, U., Sampaio, I., 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 31, 487-492.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552- 569.
- Rohde, K., 1991. Size differences in hamuli of *Kuhnia scombri* (Monogenea: Polyopisthocotylea) from different geographical areas not due to differences in host size. *Int. J. Parasitol.* 21, 113-114.

- Ruano, F., Devers, S., Sanllorente, O., Errard, C., Tinaut, A., Lenoir, A., 2011. A geographical mosaic of coevolution in a slave-making host-parasite system. *J. Evol. Biol.* (in press) doi: 10.1111/j.1420-9101.2011.02238.x.
- Sánchez, H.S., 2005. Coevolución genética de la interacción parásito-hospedero. *Ciencia Ergo Sum* 12, 144-148.
- Sbisà, E., Tanzariello, F., Reyes, A., Pesole, G., Saccone, C., 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205, 125-140.
- Shibatta, O.A., Hoffmann, A.C., 2005. Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 22, 366-371.
- Shinn, A.P., des Clers, S., Gibson, D.I., Sommerville, C., 1996. Multivariate analyses of morphometrical features from *Gyrodactylus* spp. (Monogenea) parasitising British salmonids: light microscope based studies. *Syst. Parasitol.* 33, 115-125.
- Shinn, A.P., Gibson, D.I., Sommerville, C., 2001. Morphometric discrimination of *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Monogenea) from species of *Gyrodactylus* parasitising British salmonids using novel parameters. *J. Fish Dis.* 24, 83-97.
- Shinn, A.P., Hansen, H., Olstad, K., Bachmann, L., Bakke, T.A., 2004. The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.* 51, 239-252.
- Shui, B.N., Han, Z.Q., Gao, T.X., Miao, Z.Q., 2008. Tandemly repeated sequence in 5' end of mtDNA control region of Japanese Spanish mackerel *Scomberomorus niphonius*. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4415-4422.
- Smith, T.B., Skúlason, S., 1996. Evolutionary significance of resource polymorphisms in fishes, amphibians, and birds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 111-133.
- Strauss, R.E., 1985. Evolutionary allometry and variation in body form in the South American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). *Syst. Zool.* 34, 381-396.

- Suguio, K., Martin, L., Bittencourt, A.C.S.P., Dominguez, J.M.L., Flexor, J.M., Azevedo, A.E.G., 1985. Flutuações do nível relativo do mar durante o Quaternário Superior ao longo do litoral brasileiro e suas implicações na sedimentação costeira. *Rev. Bras. Geoc.* 15, 273-286.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Thompson, J.N., 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *Am. Nat.* 153, S1-S14.
- Thompson, J.N., 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago.
- Thompson, J.N., Nuismer, S.L., Gomulkiewicz, R., 2002. Coevolution and Maladaptation. *Integ. and Comp. Biol.* 42, 381-387.
- von der Heyden, S., Lipinski, M.R., Matthee, C.A., 2010. Remarkably low mtDNA control region diversity in an abundant demersal fish. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 1183-1188.
- Ward, J.H., 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Statistical Assoc.* 58, 236-244.
- Whiteman, N.K., Kimball, R.T., Parker, P.G., 2007. Co-phylogeography and comparative population genetics of the threatened Galápagos hawk and three ectoparasite species: ecology shapes population histories within parasite communities. *Mol. Ecol.* 16, 4759-4773.
- Zhang, J., Cai, Z., Huang, L., 2006. Population genetic structure of crimson snapper *Lutjanus erythropterus* in East Asia, revealed by analysis of the mitochondrial control region. *J. Mar. Sci.* 63, 693-704.
- Ziętara, M.S., Kuusela, J., Lumme, J., 2006. Escape from an evolutionary dead end: a triploid clone of *Gyrodactylus salaris* is able to revert to sex and switch host (Platyhelminthes, Monogenea, Gyrodactylidae). *Hereditas* 143, 84-90.



- Ziętara, M.S., Lumme, J., 2002. Speciation by host switch and adaptive radiation in a fish parasite genus *Gyrodactylus* (Monogenea, Gyrodactylidae). *Evolution* 56, 2445-2458.
- Ziętara, M.S., Lumme, J., 2003. The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Syst. Parasitol.* 55, 39-52.

## Legenda das Figuras

**Fig. 1.** Imagem de satélite da baía de Paranaguá, estado do Paraná, mostrando a área de estudo.

Os números correspondem aos locais de coleta: (1) rio Marumbi, município de Morretes; (2) rio do Pinto, município de Morretes; (3) rio Ribeirão, município de Paranaguá; (4) rio Fortuna, município de Pontal do Paraná. Fonte do mapa: Google Maps (<http://maps.google.com.br>).

**Fig. 2.** Distâncias morfométricas obtidas para os hospedeiros *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*. CF = comprimento do focinho; CC = comprimento da cabeça; DPD = distância pré-dorsal; AC = altura do corpo; CBD = comprimento da base da nadadeira dorsal; DDAD = distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa; CBA = comprimento da base da nadadeira anal; APC = altura do pedúnculo caudal; CP = comprimento padrão.

**Fig. 3.** Dendograma da análise de cluster baseada nas distâncias morfométricas de âncoras e ganchos de espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. (A) Espécies de *Gyrodactylus* coletadas em *S. barbatus*. (B) Grupo representado por espécimes de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletados, em sua maioria, na sub-bacia da baía de Paranaguá. (C) Grupo representado por espécimes de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletados, em sua maioria, na sub-bacia do rio Nhundiaquara. (D) Espécies de *Gyrodactylus* coletadas em *S. macropterus*. As cores e siglas dos táxons representam as espécies parasitas: em azul, *Gyrodactylus* n.sp. 1 (G1); em vermelho, *Gyrodactylus* n.sp. 2 (G2); em verde, *Gyrodactylus* n.sp. 3 (G3); em preto, *Gyrodactylus* n.sp. 4 (G4). As letras iniciais de cada táxon indicam os hospedeiros (M = *S. macropterus*; B = *S. barbatus*), e as letras finais a localidade (P = sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara – destacado em fundo cinza). O asterisco (\*) indica espécimes de parasitos coletados em uma espécie hospedeira diferente da maioria de seus coespecíficos.

**Fig. 4.** Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada no gene SRP54, mostrando o relacionamento filogenético de populações de *Scleromystax*. As letras iniciais e cores dos táxons indicam a espécie hospedeira (M = *S. macropterus* – em azul; B = *S. barbatus* – em verde), e as letras finais a localidade (P = sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara – destacado em fundo cinza). São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

**Fig. 5.** Estrutura secundária de D-loop de *Scleromystax barbatus*. (A) Consenso da estrutura secundária de D-loop de populações de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (B) Consenso da estrutura secundária de D-loop de populações de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá. Diferentes tonalidades no pareamento de nucleotídeos representam a intensidade de mutações genéticas de D-loop: em preto, regiões conservadas; em cinza, regiões variáveis; em branco, regiões hipervariáveis. A seta indica o início (5') da região D-loop. Os números indicam a formação de hélices na estrutura secundária. São apresentados valores de energia mínima livre (MFE) para cada uma das estruturas.

**Fig. 6.** Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada em D-loop, mostrando o relacionamento filogenético de populações de *Scleromystax*. Barras horizontais cinzas representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade para cada data de divergência obtida pela análise de relógio molecular. As letras iniciais e cores dos táxons indicam a espécie hospedeira (M = *S. macropterus* – em azul; B = *S. barbatus* – em verde), e as letras finais a localidade (P = sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara – destacado em fundo cinza). Ao lado direito de cada táxon, são apresentados seus respectivos haplótipos (H). O asterisco (\*) indica haplótipos de *S. barbatus* compartilhados entre populações de sub-bacias distintas. São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

**Fig. 7.** Demografia histórica de populações de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. (A) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *S. macropterus*. (B) Frequência das diferenças pareadas de *S. macropterus*. (C) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (D) Frequência das diferenças pareadas de *S. barbatus* da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (E) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá. (F) Frequência das diferenças pareadas de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá. Nos gráficos de análise Bayesiana, a linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio ( $N_e$ ); as linhas cinzas representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade.

**Fig. 8.** Estrutura secundária de espaçador interno transcrito 2 (ITS2) de espécies de *Gyrodactylus*. (A) Consenso da estrutura secundária de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp.1. (B) Consenso da estrutura secundária de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 2. (C) Consenso da estrutura secundária de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 3. (D) Consenso da estrutura secundária de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 4. Diferentes tonalidades no pareamento de nucleotídeos representam a intensidade de mutações genéticas de ITS2: em preto, regiões conservadas; em cinza, regiões variáveis. As setas nas figuras A–D representam o início (5') de ITS2. Os números indicam a formação de hélices na estrutura secundária. (E) Estrutura secundária da hélice III de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 1. (F) Estrutura secundária da hélice III de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 2. (G) Estrutura secundária da hélice III de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 3. (H) Estrutura secundária da hélice III de ITS2 de *Gyrodactylus* n.sp. 4. As setas nas figuras E–H representam o início (5') da hélice III. São apresentados valores de energia mínima livre (MFE) para cada uma das estruturas secundárias de ITS2.

**Fig. 9.** Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada no gene ZMP, mostrando o relacionamento filogenético de suprapopulações de *Gyrodactylus*. As cores e siglas dos táxons

representam as espécies parasitas: em azul, *Gyrodactylus* n.sp. 1 (G1); em vermelho, *Gyrodactylus* n.sp. 2 (G2); em verde, *Gyrodactylus* n.sp. 3 (G3). As letras iniciais de cada táxon indicam os hospedeiros (M = *S. macropterus*; B = *S. barbatus*), e as letras finais a localidade (P = sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara – destacado em fundo cinza). São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

**Fig. 10.** Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada no gene COII, mostrando o relacionamento filogenético de suprapopulações de *Gyrodactylus*. Barras horizontais cinzas representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade para cada data de divergência obtida pela análise de relógio molecular. As cores e siglas dos táxons representam as espécies parasitas: em azul, *Gyrodactylus* n.sp. 1 (G1); em vermelho, *Gyrodactylus* n.sp. 2 (G2); em verde, *Gyrodactylus* n.sp. 3 (G3); em preto, *Gyrodactylus* n.sp. 4 (G4). As letras iniciais de cada táxon indicam os hospedeiros (M = *S. macropterus*; B = *S. barbatus*), e as letras finais a localidade (P = sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara – destacado em fundo cinza). Ao lado direito de cada táxon, são apresentados seus respectivos haplótipos (H). O asterisco (\*) indica espécimes de parasitos coletados em uma espécie hospedeira diferente da maioria de seus coespecíficos. São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

**Fig. 11.** Cladograma enraizado da análise Bayesiana baseada nas sequências de aminoácidos de COII, mostrando o relacionamento filogenético de espécies de *Gyrodactylus*. As cores e siglas dos táxons representam, respectivamente, espécies parasitas e haplótipos (H): em azul, *Gyrodactylus* n.sp. 1 (G1); em vermelho, *Gyrodactylus* n.sp. 2 (G2); em verde, *Gyrodactylus* n.sp. 3 (G3); em preto, *Gyrodactylus* n.sp. 4 (G4). Haplótipos coletados na sub-bacia do rio Nhundiaquara estão destacados em fundo cinza. São apresentados valores de probabilidade posterior acima de 50%.

**Fig. 12.** Demografia histórica de suprapopulações de *Gyrodactylus*. (A) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 1. (B) Frequência das diferenças pareadas de *Gyrodactylus* n.sp. 1. (C) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 2. (D) Frequência das diferenças pareadas de *Gyrodactylus* n.sp. 2. (E) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (F) Frequência das diferenças pareadas de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (G) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá. (H) Frequência das diferenças pareadas de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá. (I) Reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 4. (J) Frequência das diferenças pareadas de *Gyrodactylus* n.sp. 4. Nos gráficos de análise Bayesiana, a linha escura representa o tamanho efetivo populacional médio ( $N_e$ ); as linhas cinzas representam intervalo de 95% de probabilidade da densidade.

**Fig. 13.** Análise comparativa da história demográfica de espécies de *Gyrodactylus* e *Scleromystax* durante os últimos 200.000 anos. As cores correspondem a períodos glaciais (em azul) e interglaciais (em laranja) entre o final do Pleistoceno e parte do Holoceno. A linha contínua representa a reconstrução Bayesiana da história demográfica de *Gyrodactylus* n.sp. 4, enquanto que a linha pontilhada a reconstrução Bayesiana da história demográfica de *S. barbatus*.

**Fig. 14.** Mapeamento da especificidade ao hospedeiro de espécies de *Gyrodactylus*. Os hospedeiros foram mapeados no cladograma da análise bayesiana de COII como se fossem caracteres (em cinza, *Scleromystax barbatus*; em preto, *Scleromystax macropterus*). As siglas acima do cladograma indicam a espécie parasita: G1 = *Gyrodactylus* n.sp. 1; G2 = *Gyrodactylus* n.sp. 2; G3 = *Gyrodactylus* n.sp. 3; G4 = *Gyrodactylus* n.sp. 4. As letras iniciais de cada táxon indicam os hospedeiros (M = *S. macropterus*; B = *S. barbatus*), e as letras finais a localidade (P

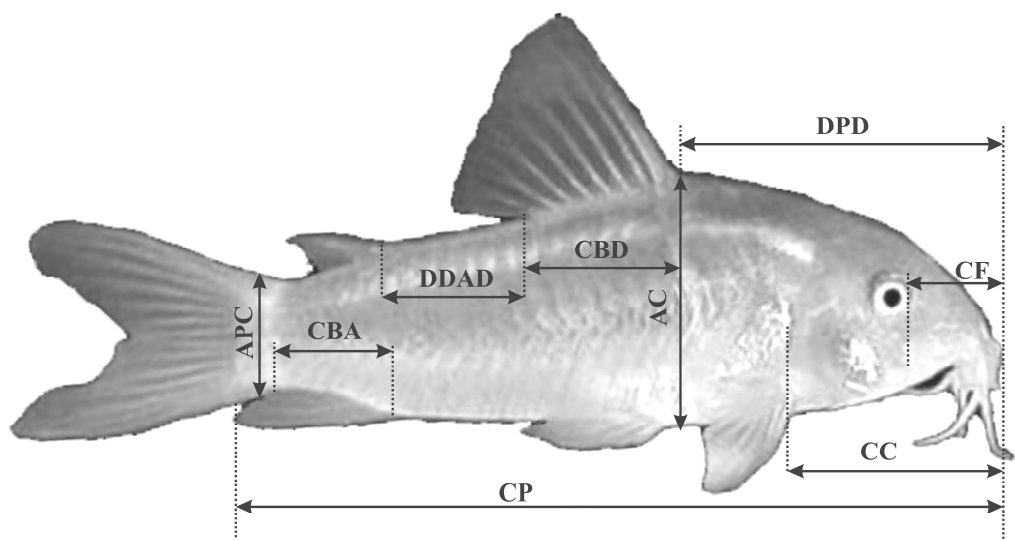
= sub-bacia da baía de Paranaguá; N = sub-bacia do rio Nhundiaquara). O asterisco (\*) indica eventos de troca de hospedeiro. Os valores nos ramos representam a probabilidade posterior.

**Fig. 15.** Análise da distribuição de espécies de *Gyrodactylus* entre *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*. O número de eventos de dispersão (troca de hospedeiro) no cladograma da análise Bayesiana (indicado pela seta;  $n = 4$ ) indica que a distribuição das espécies parasitas entre hospedeiros distintos não ocorreu ao acaso ( $P < 0,001$ ). Colunas em cinza claro simulam a distribuição casual das espécies de *Gyrodactylus* entre hospedeiros distintos (i.e. se não houvesse especificidade ao hospedeiro).

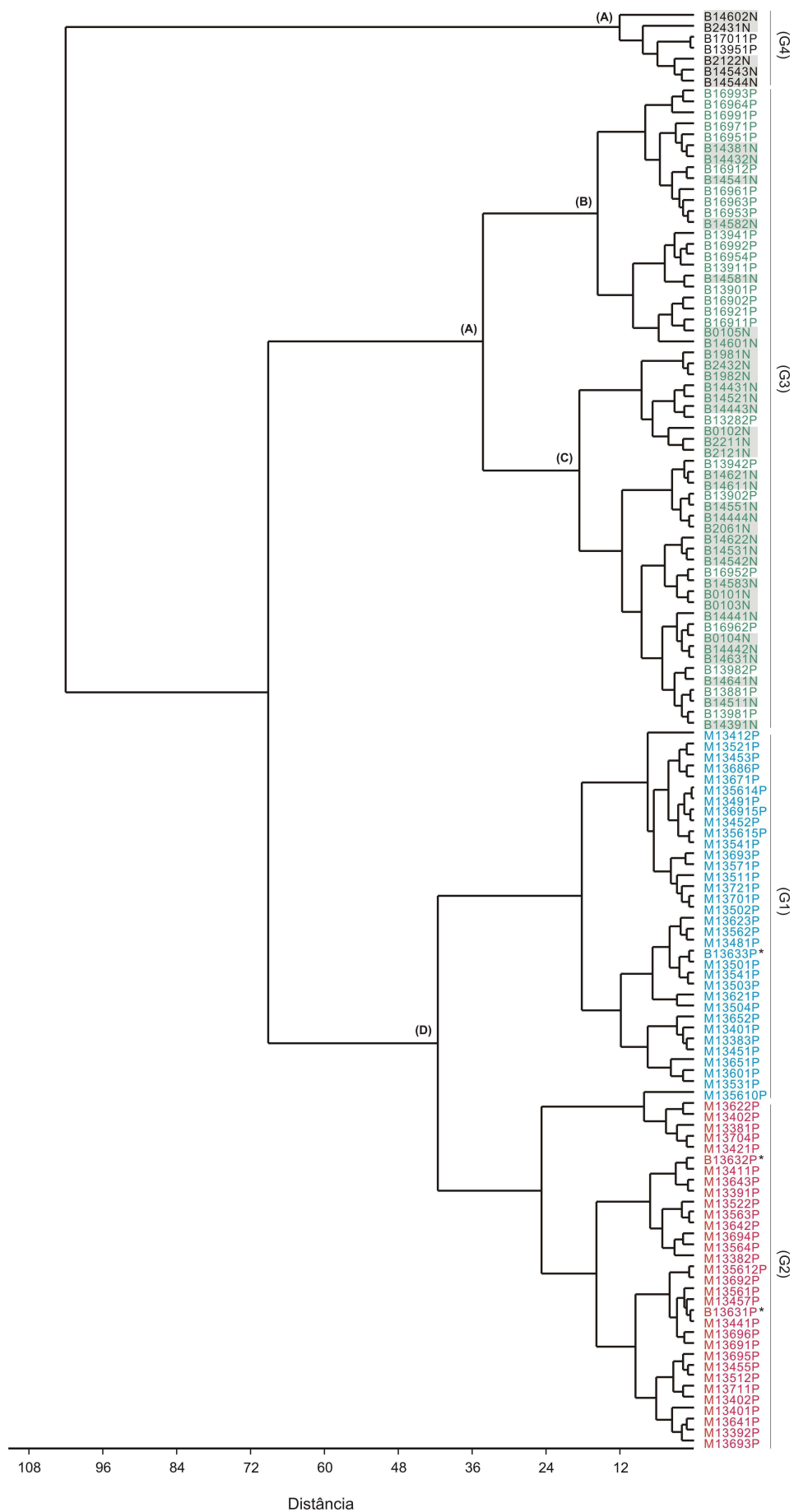


**Figura 1**

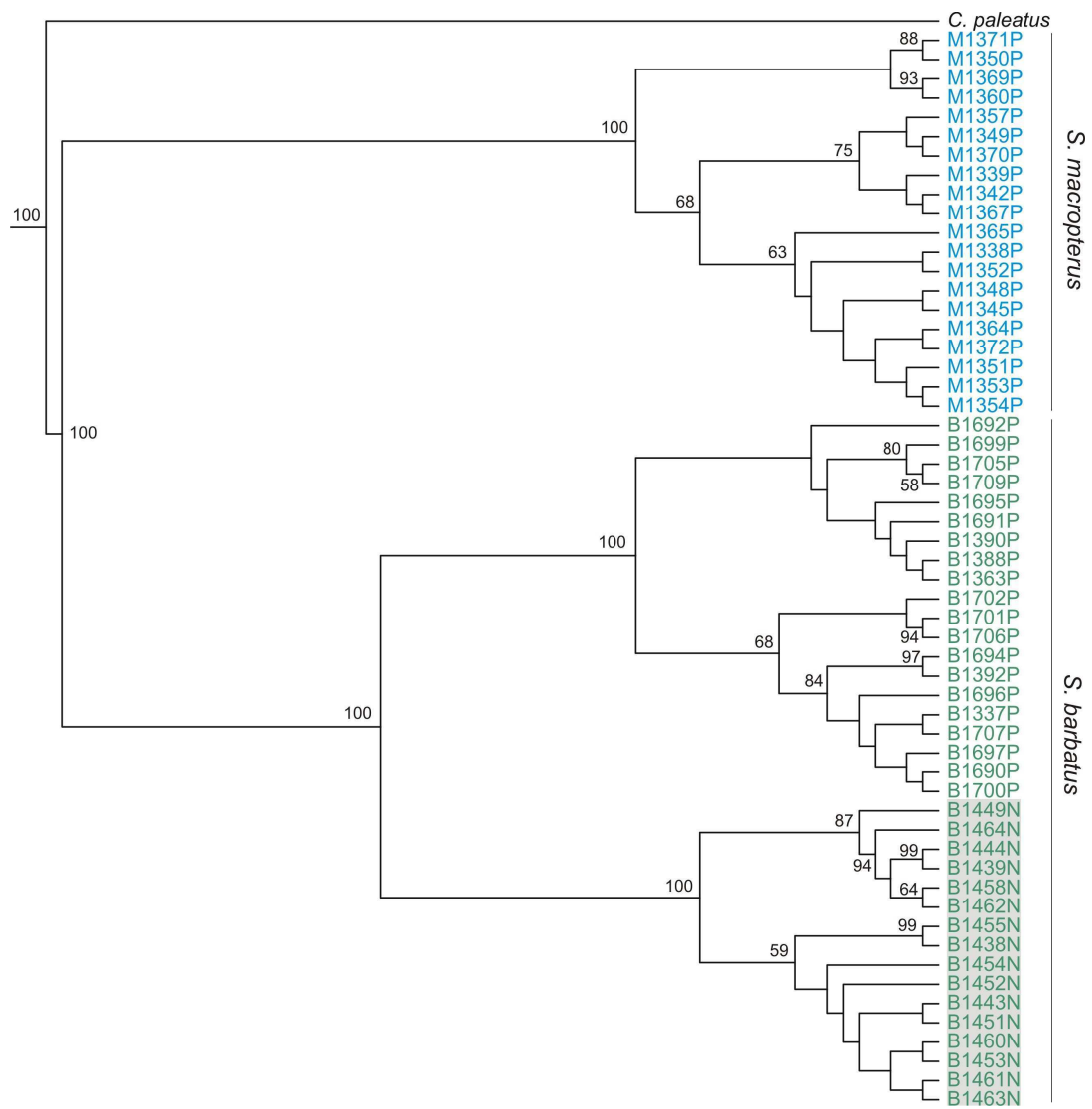




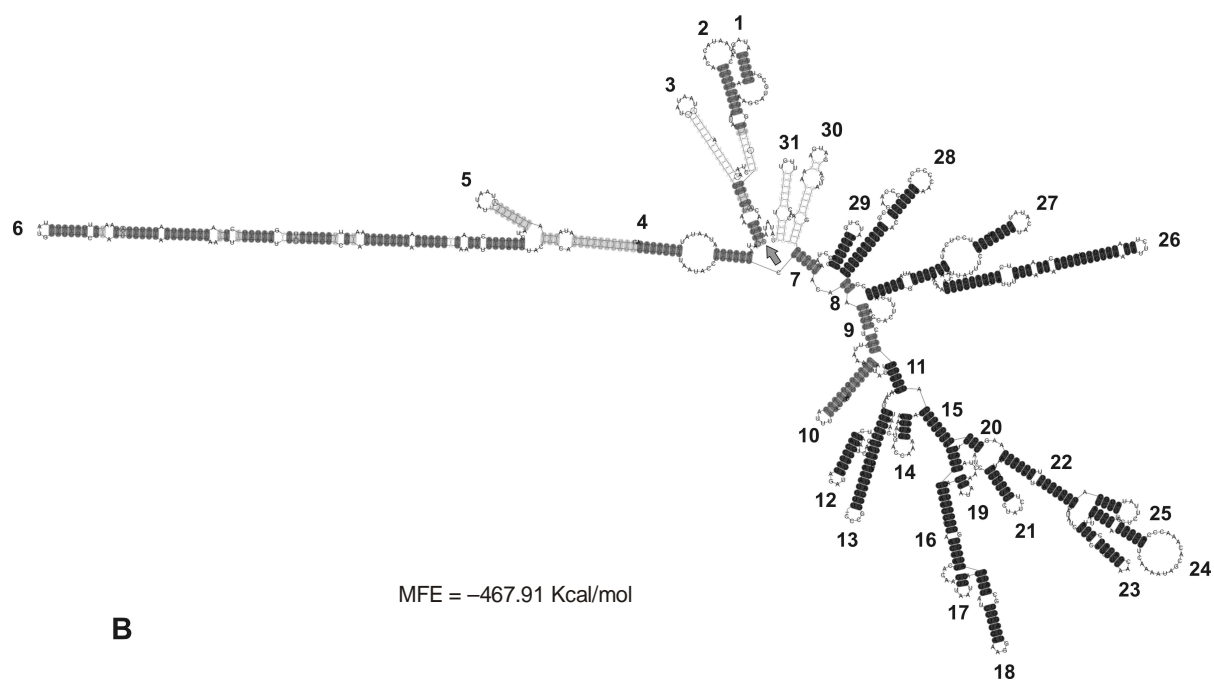
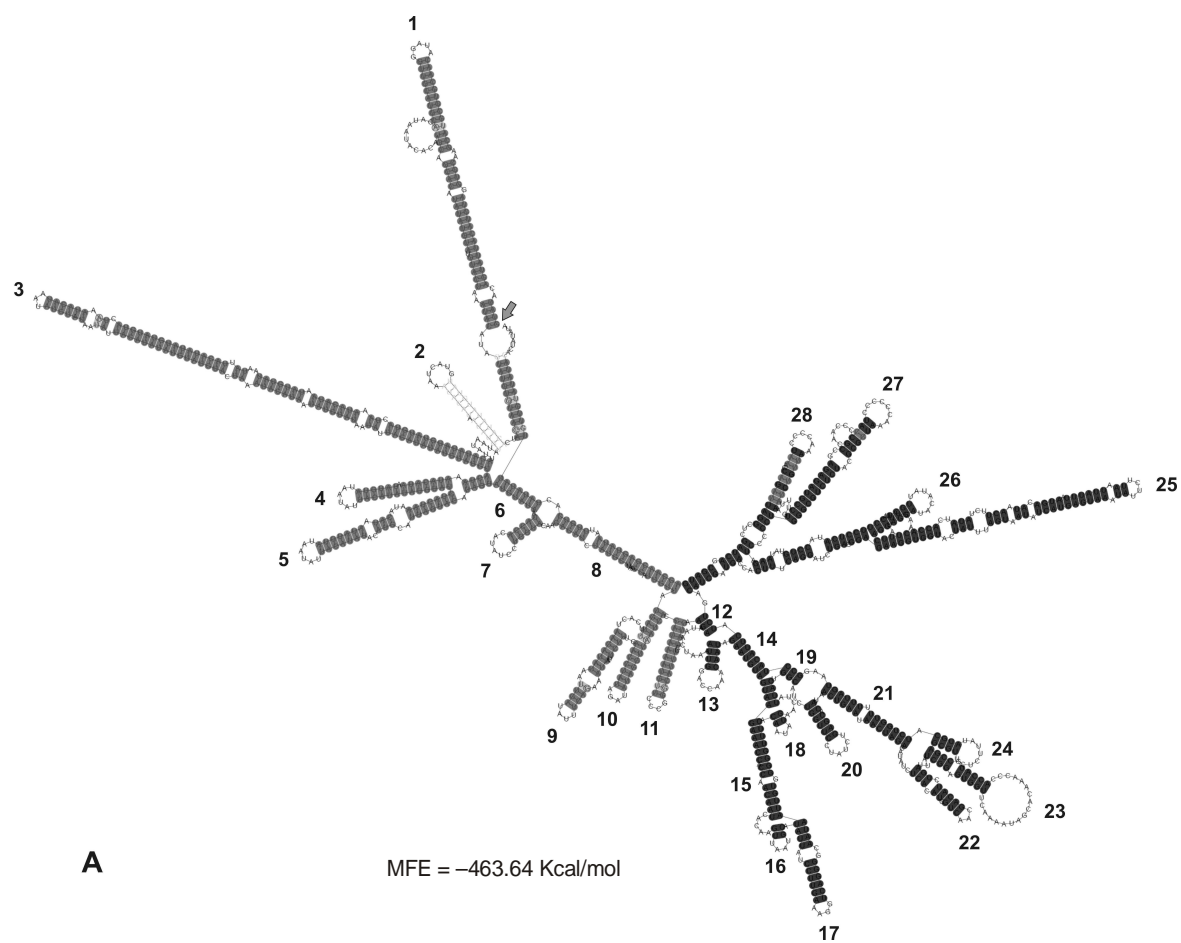
**Figura 2**



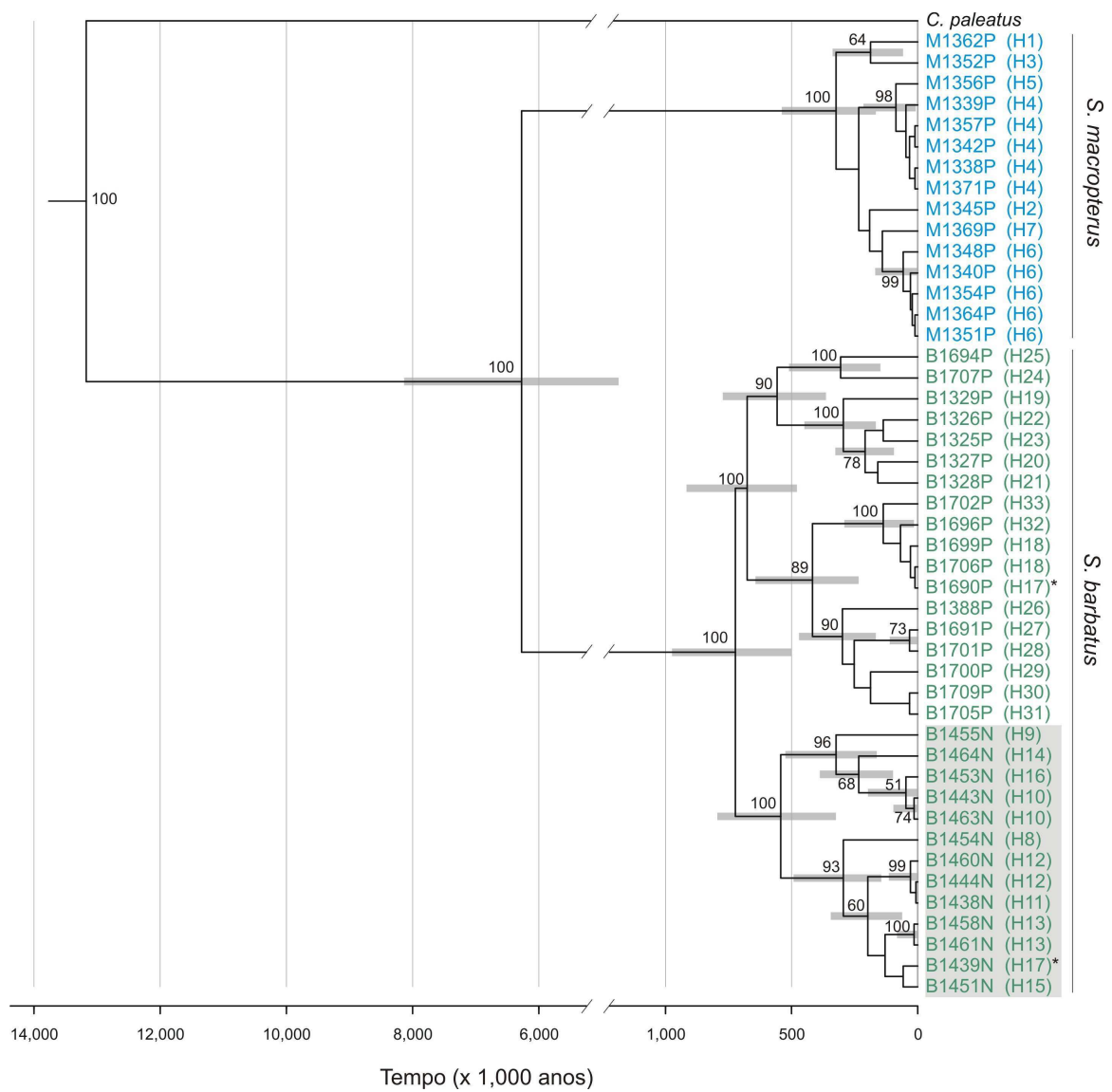
**Figura 3**



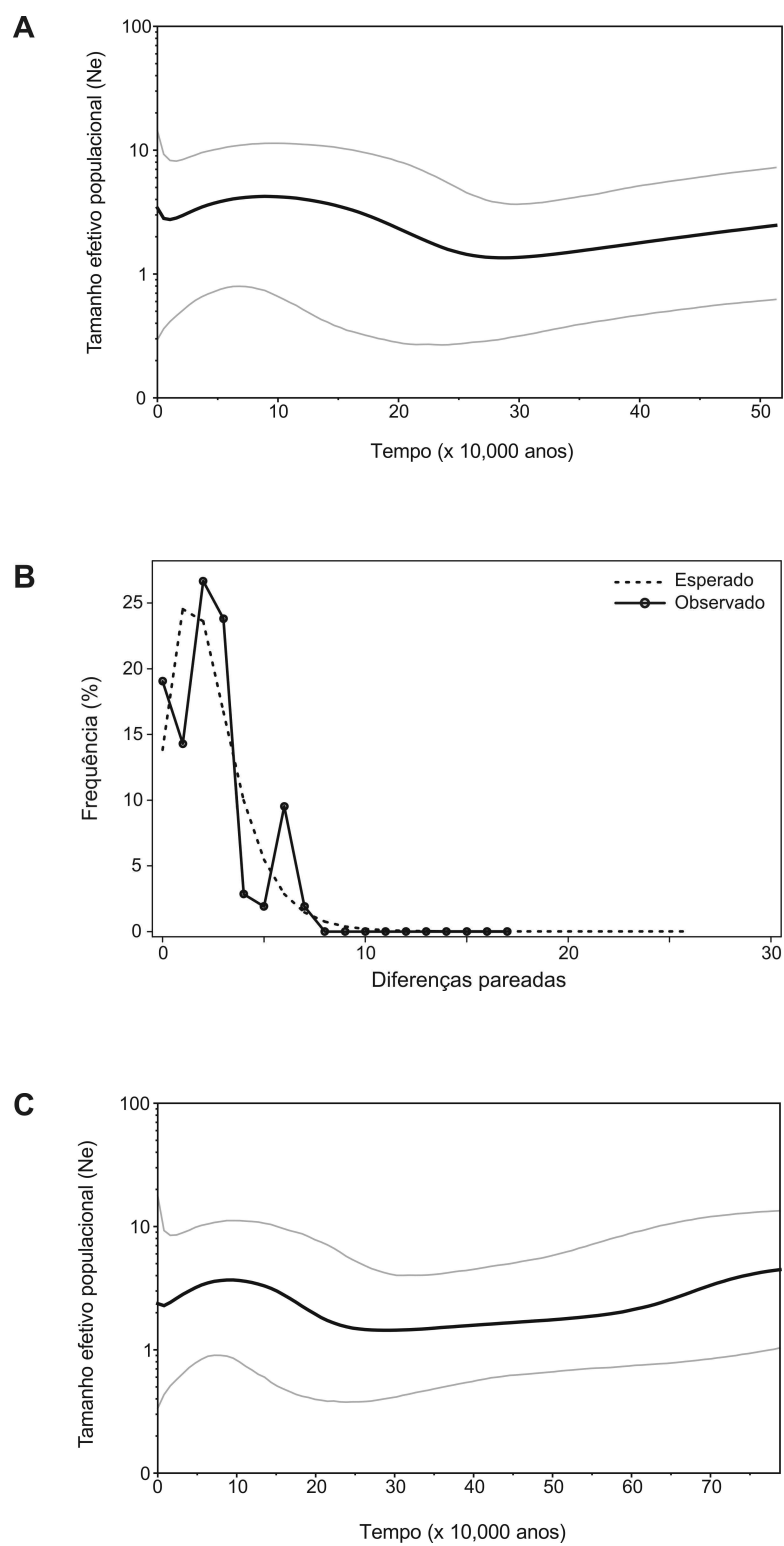
**Figura 4**



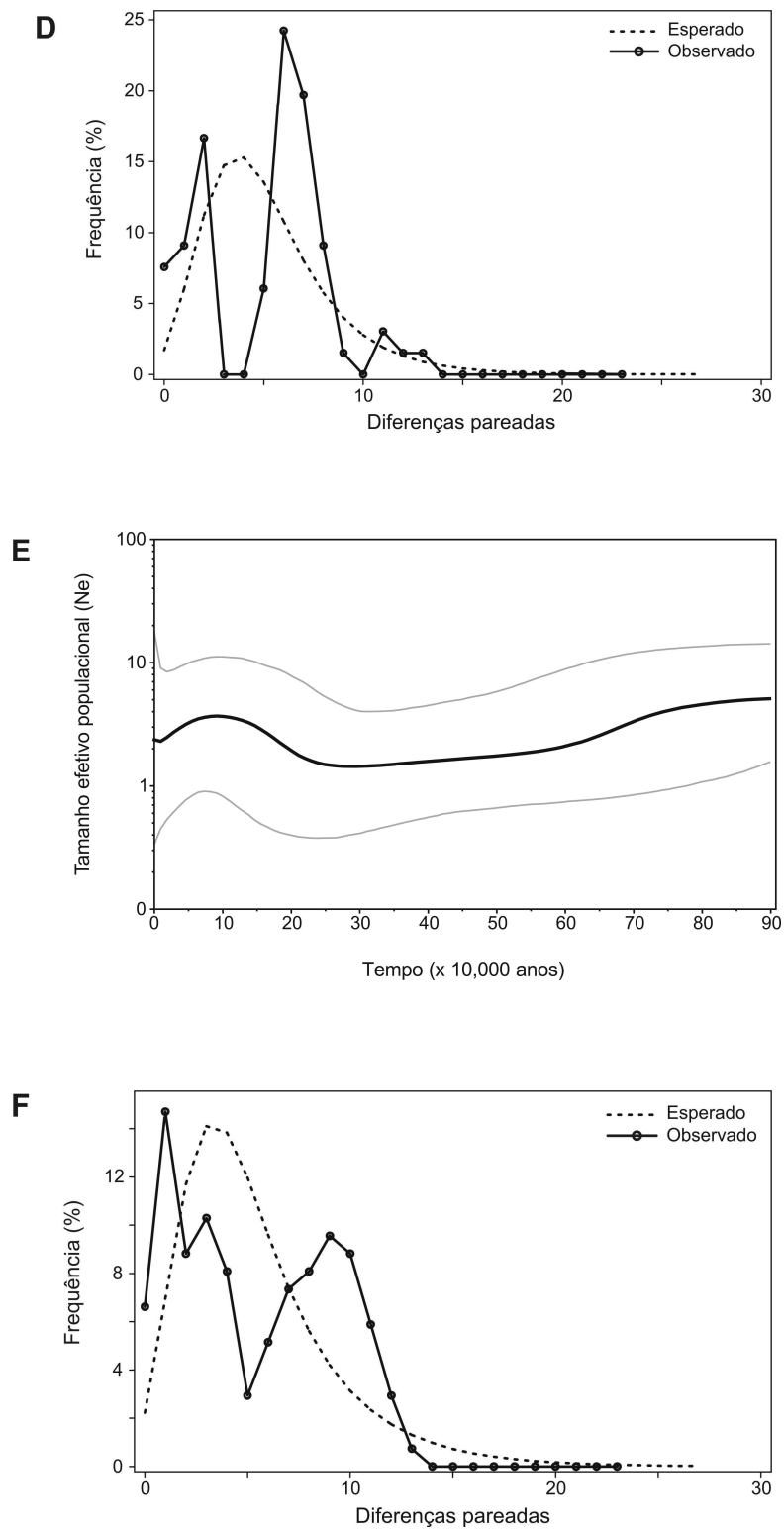
**Figura 5**



**Figura 6**

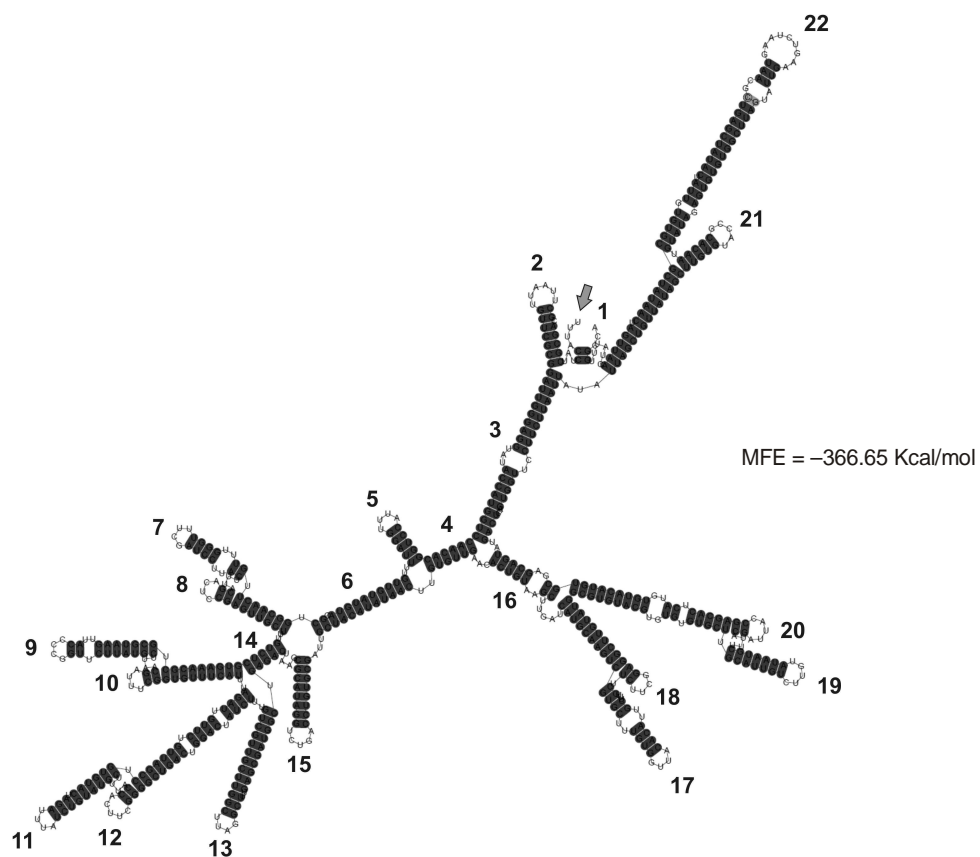


**Figura 7**

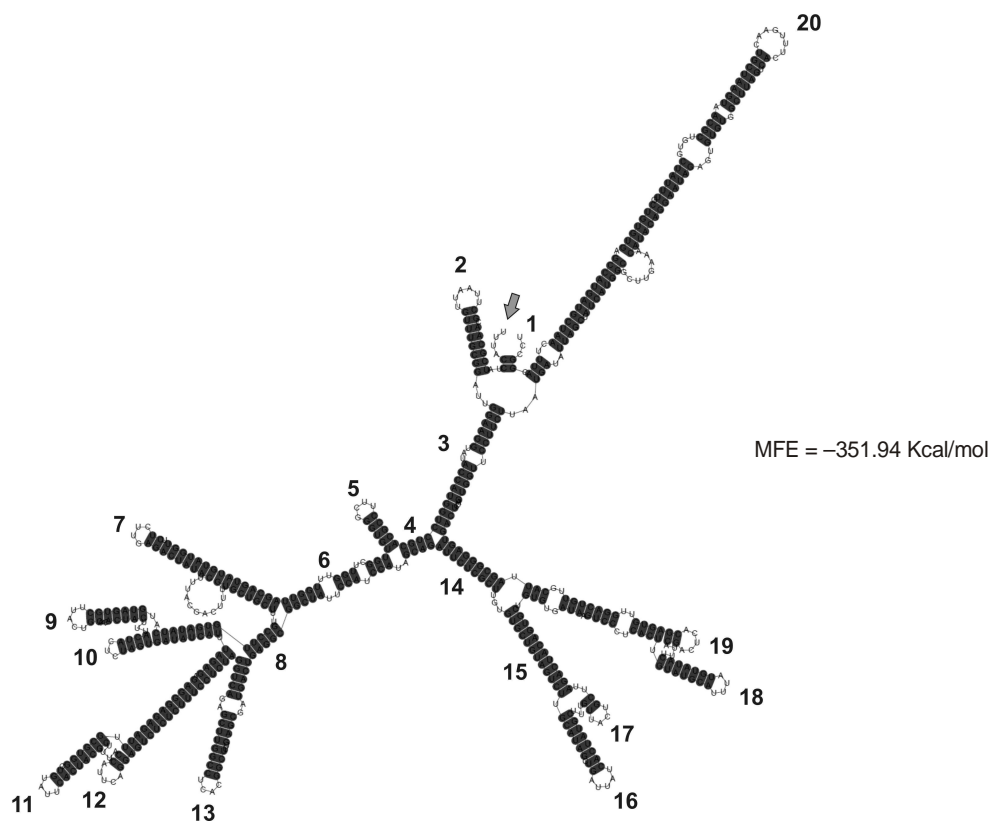


**Figura 7**

**A**



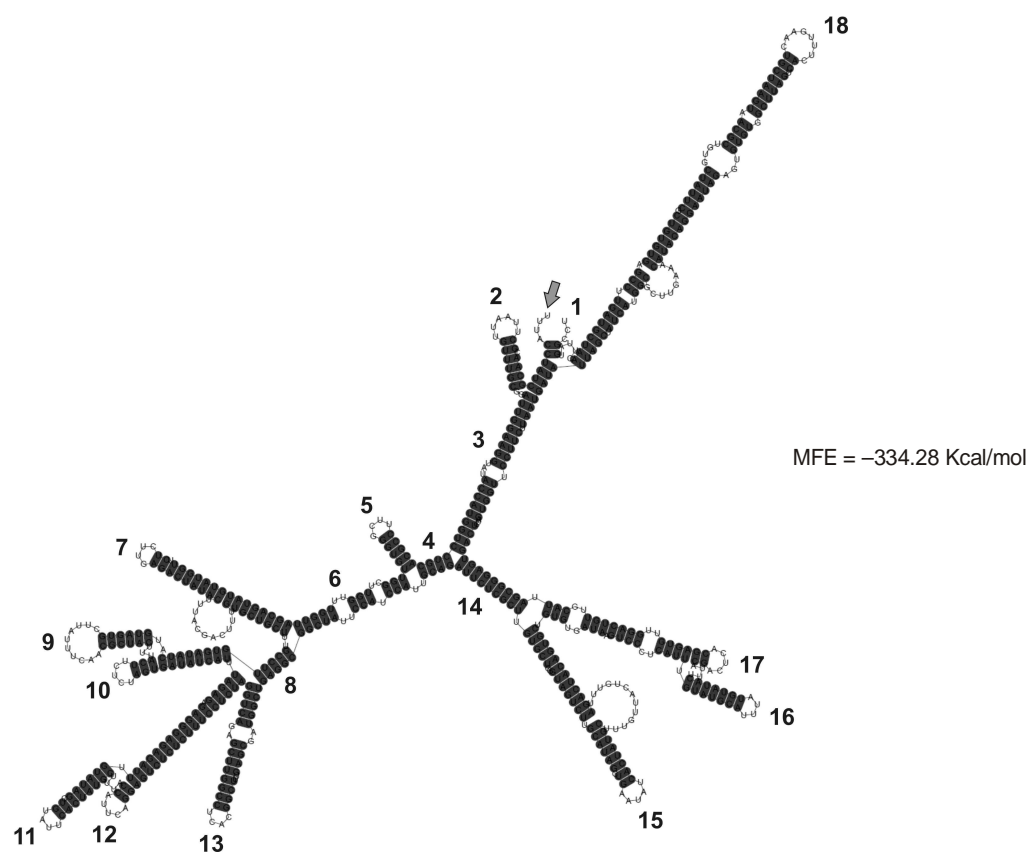
**B**



**Figura 8**



C



D

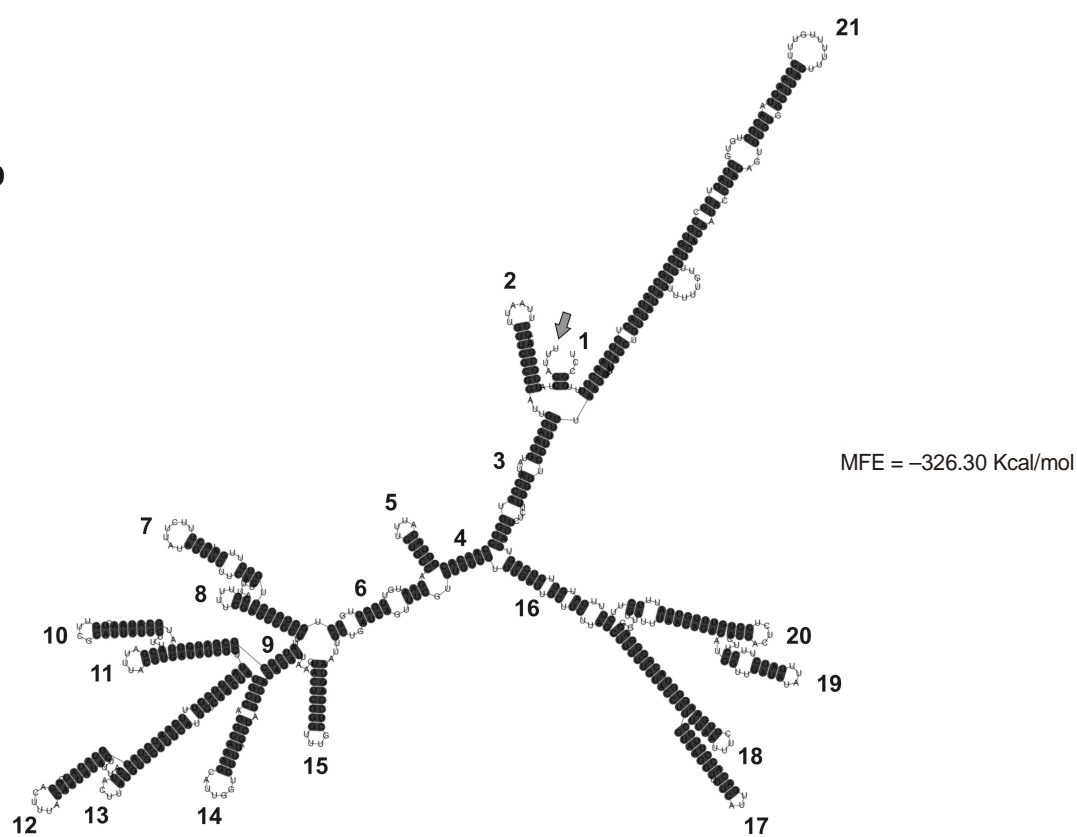
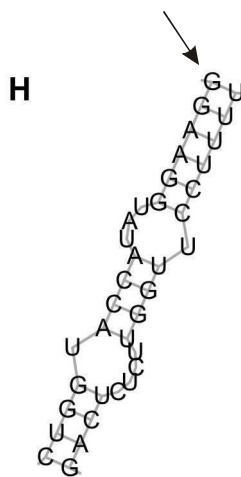
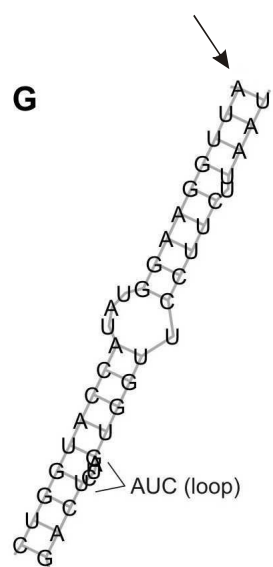
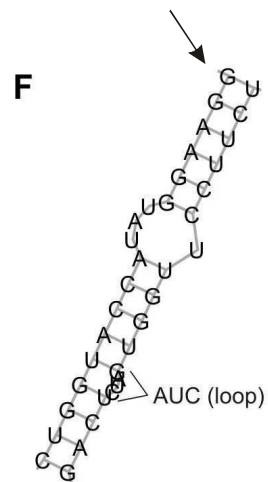
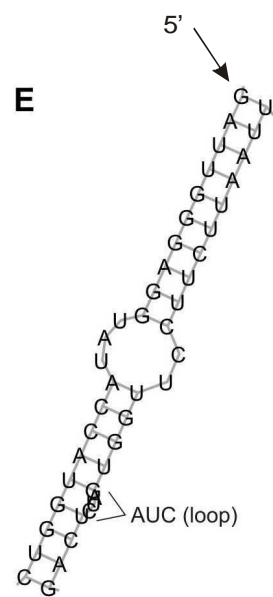
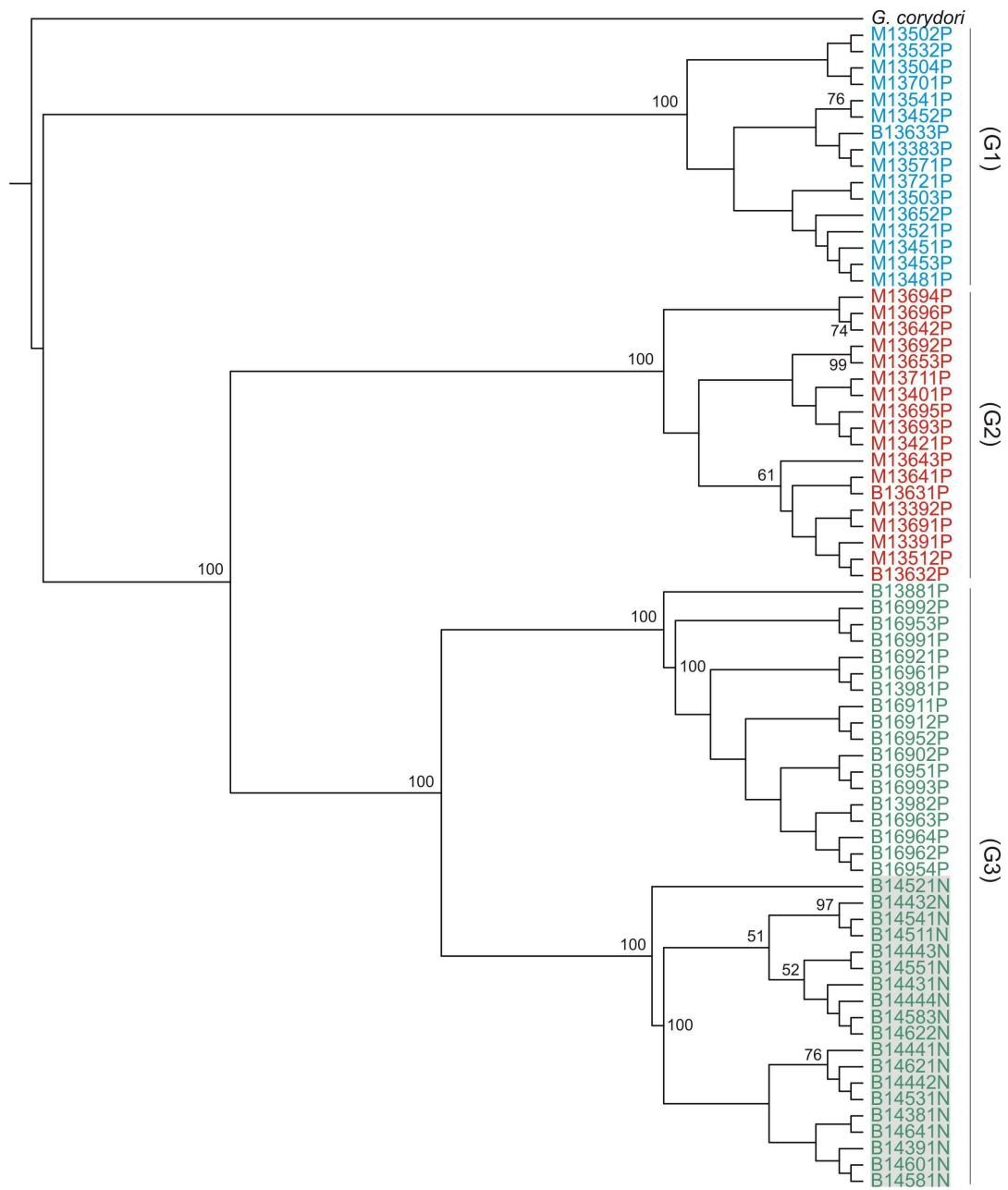


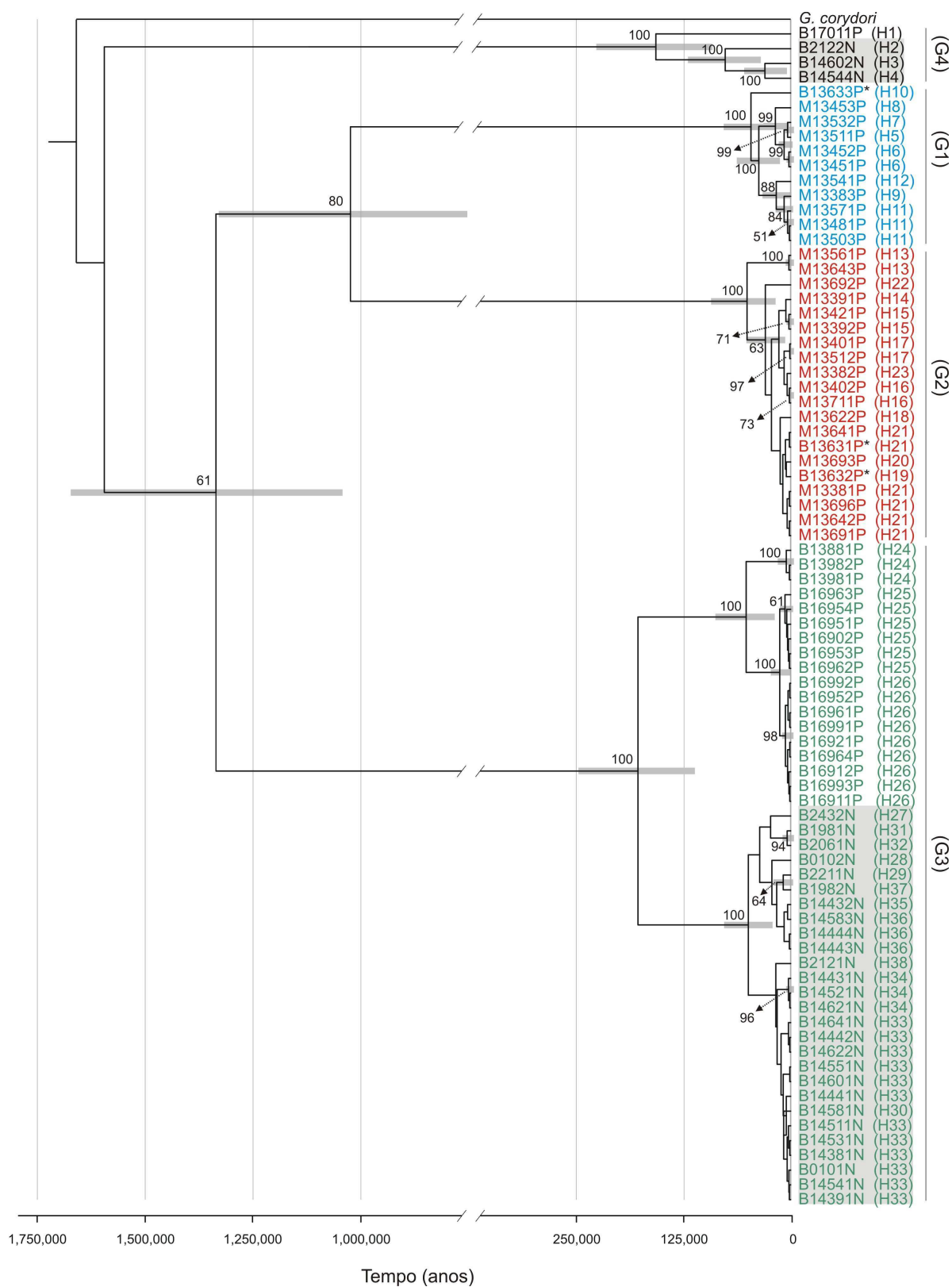
Figura 8



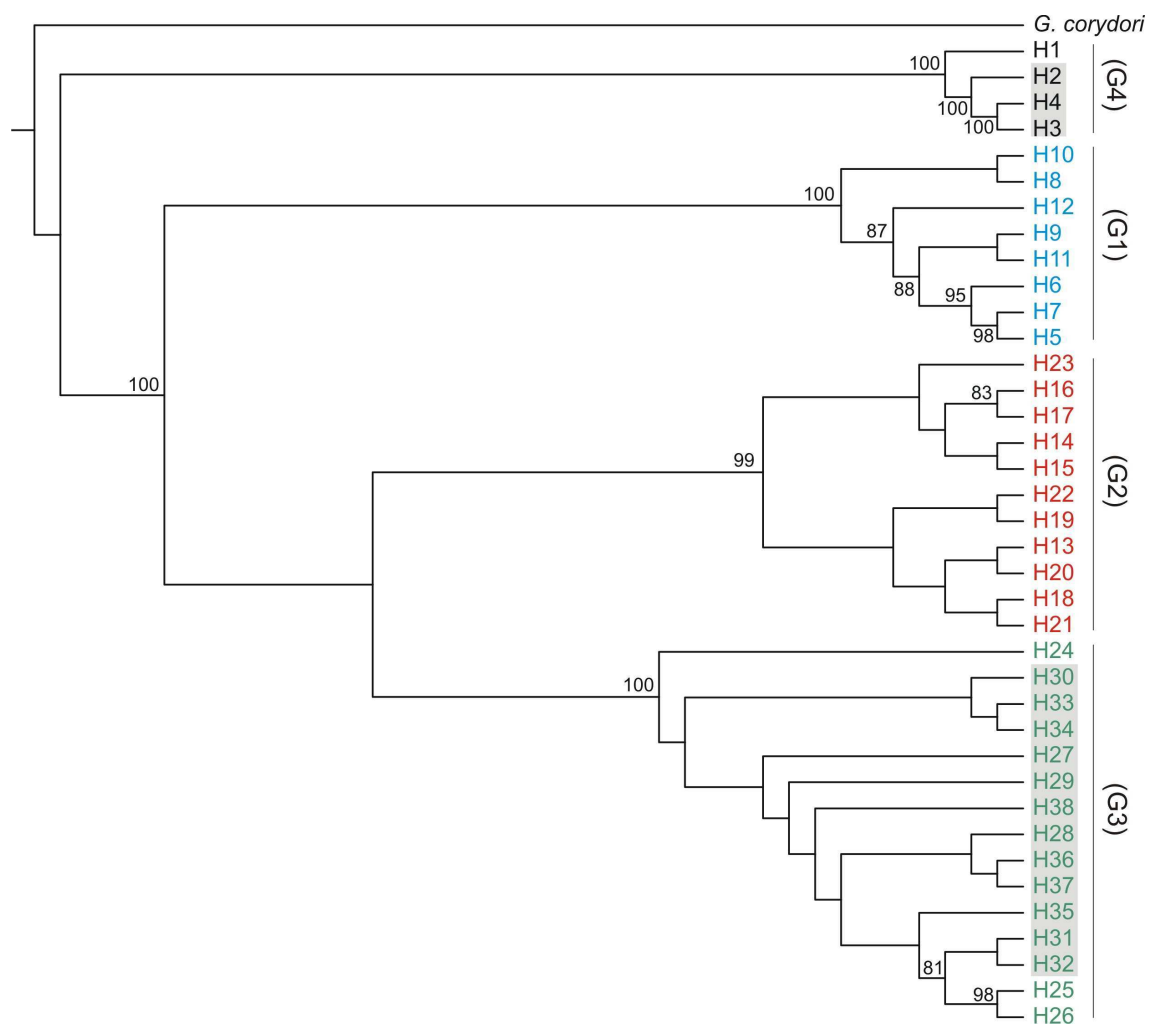
**Figura 8**



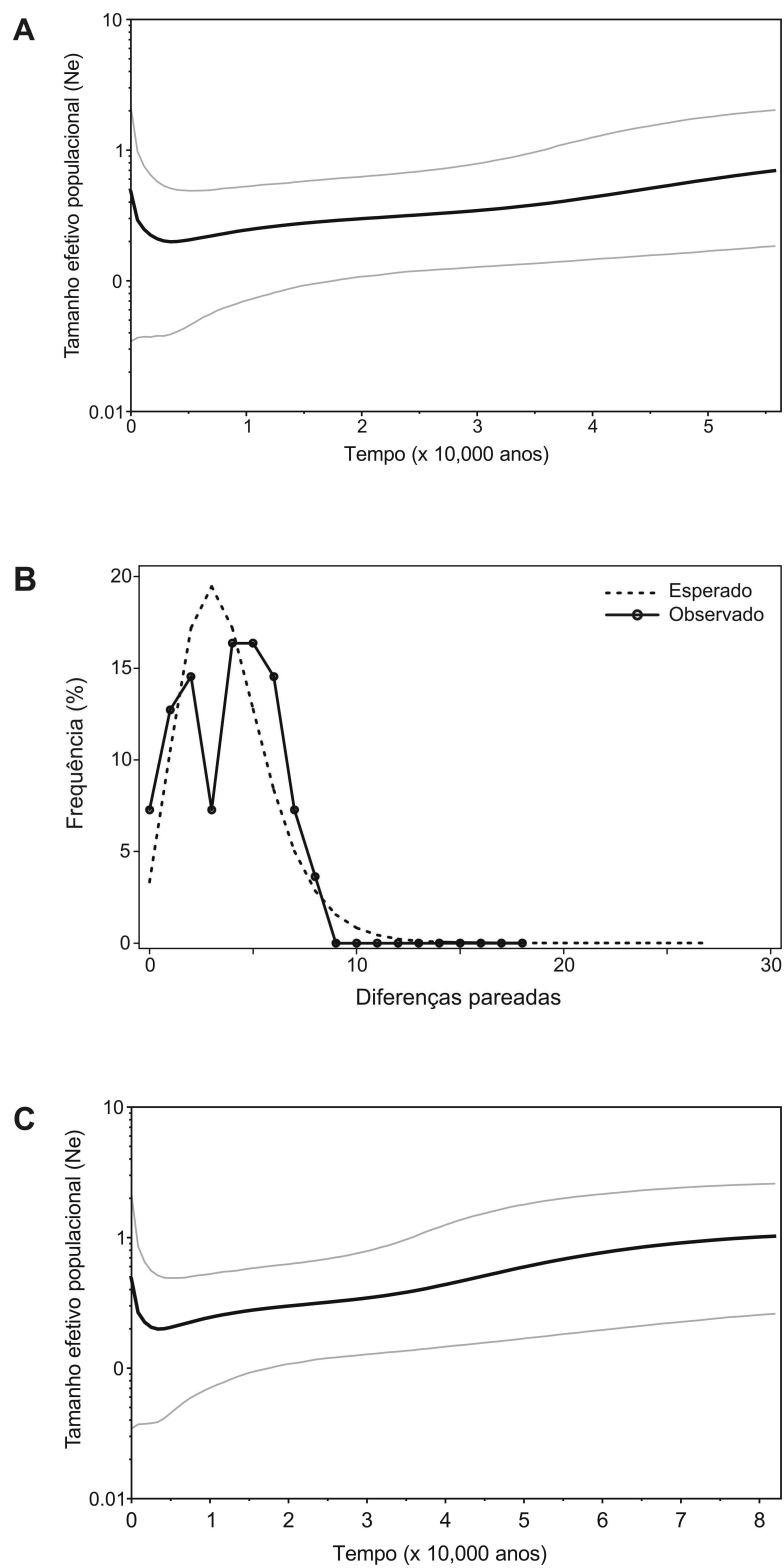
**Figura 9**



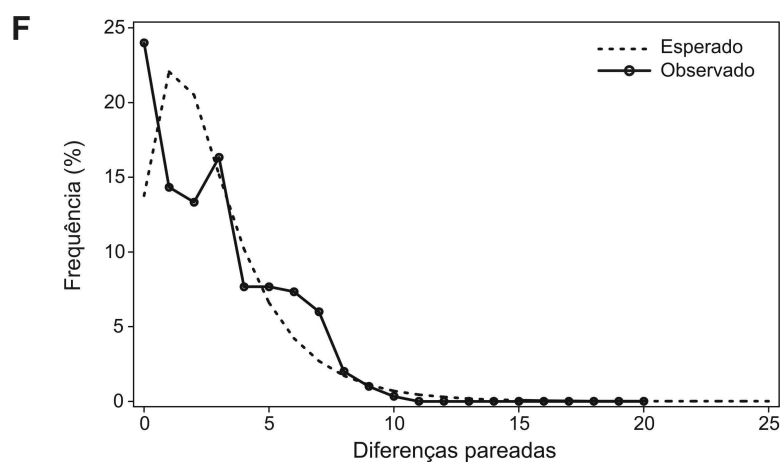
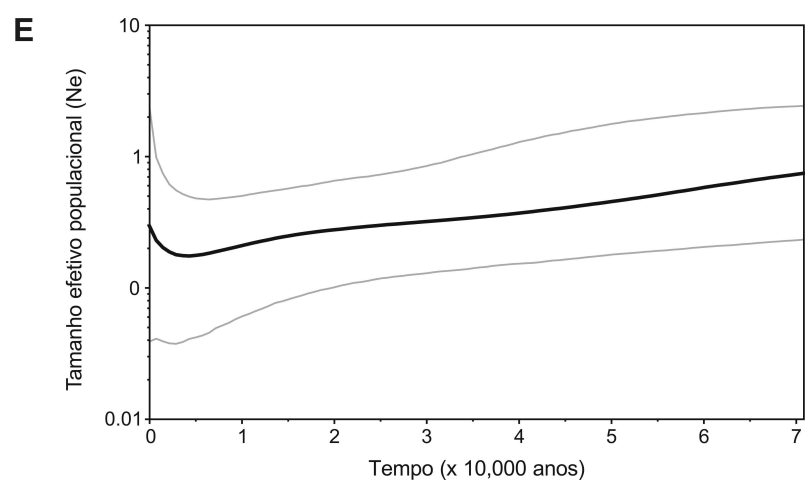
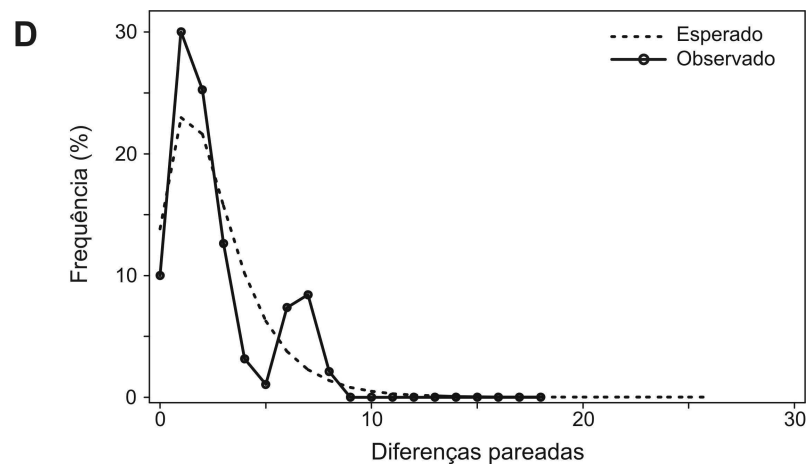
**Figura 10**



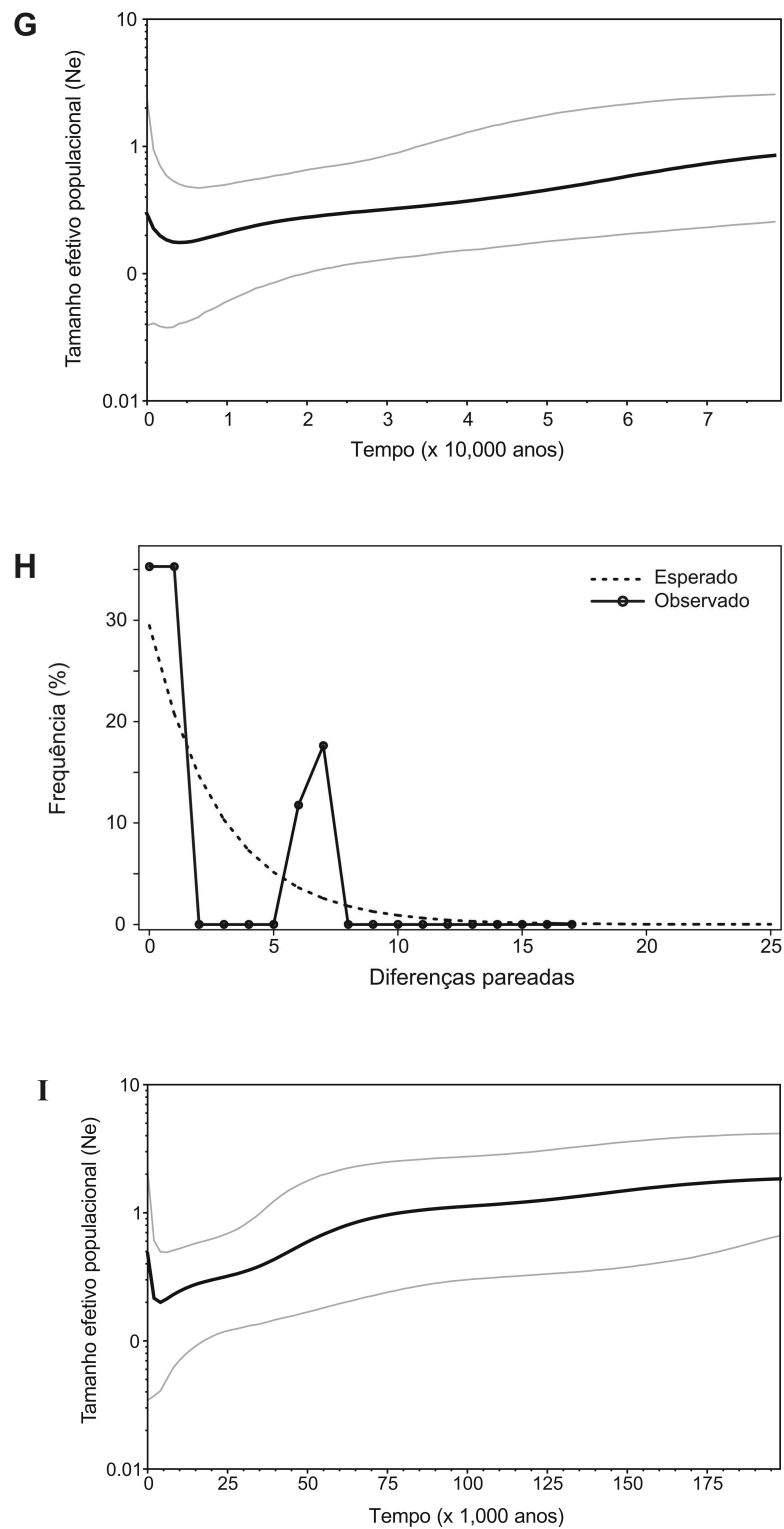
**Figura 11**



**Figura 12**

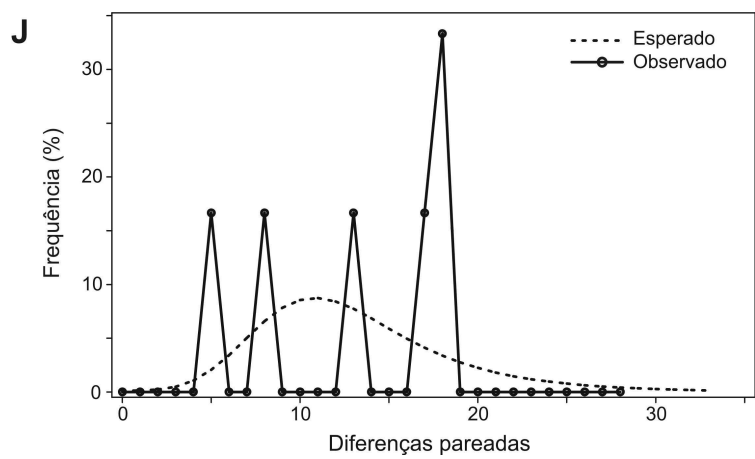


**Figura 12**

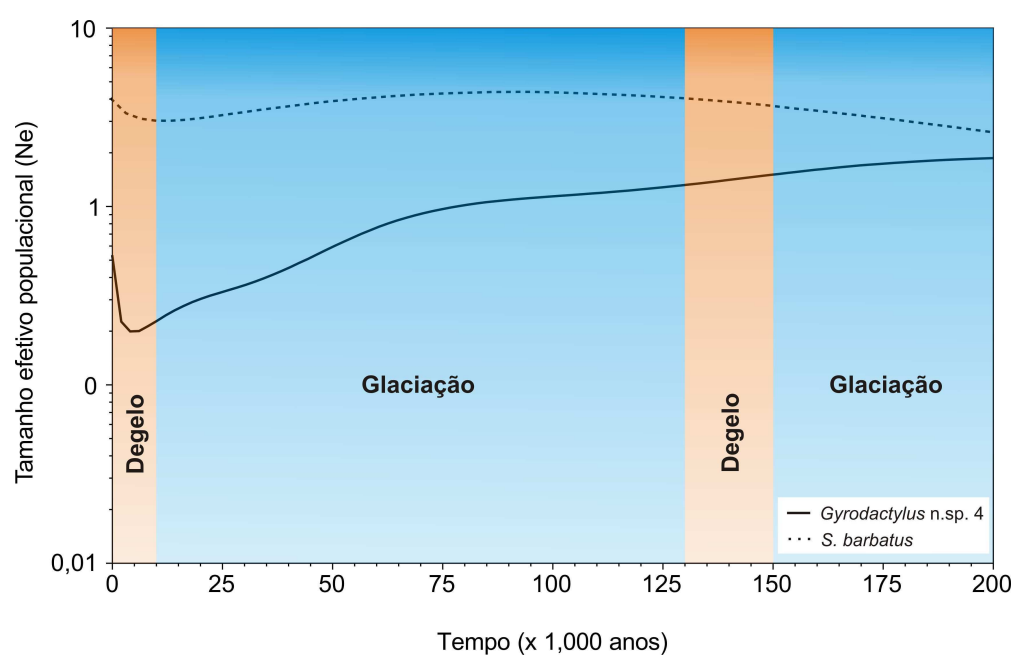


**Figura 12**





**Figura 12**



**Figura 13**

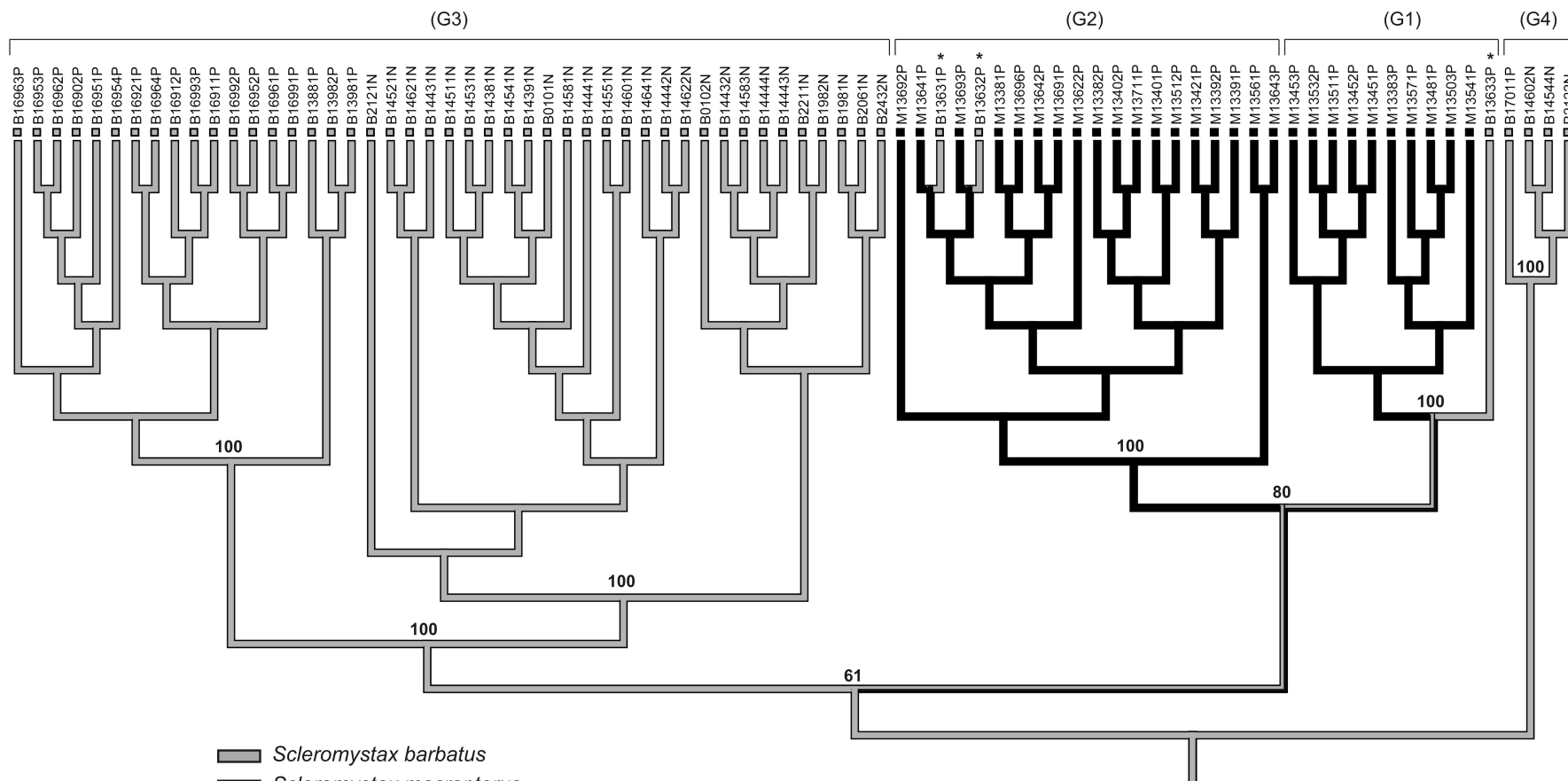
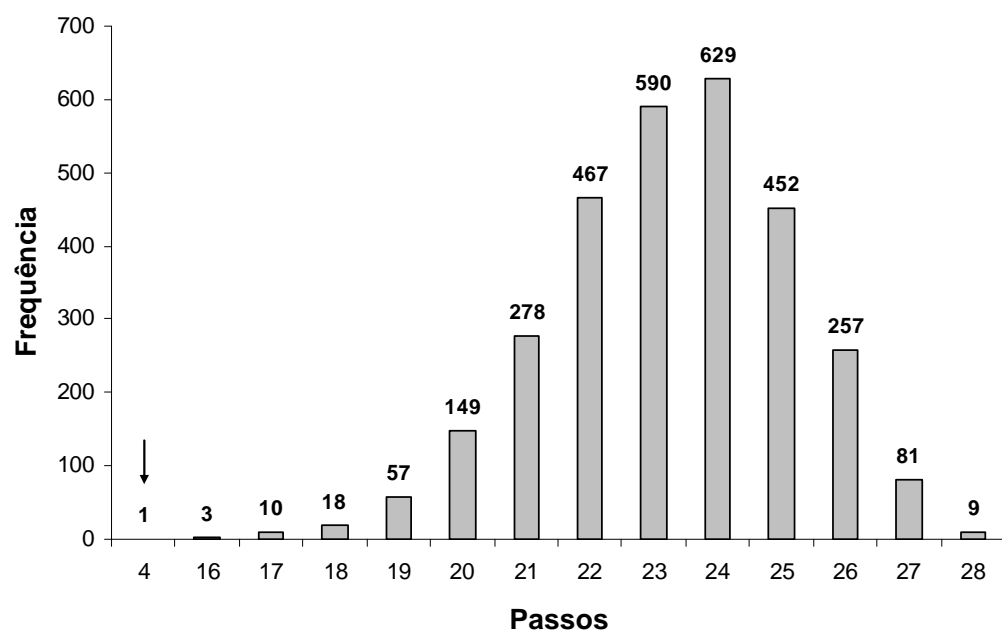


Figura 14



**Figura 15**

**Tabela 1**

Ocorrência, prevalência e intensidade média de quatro espécies de *Gyrodactylus* coletadas em *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus* na bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil. Os valores, entre parênteses, indicam respectivamente prevalência (em %) e intensidade média.

Hospedeiros	Sub-bacia baía de Paranaguá		Sub-bacia rio Nhundiaquara	
	Rio Fortuna	Rio Ribeirão	Rio do Pinto	Rio Marumbi
<i>S. macropterus</i>	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 1			
	(76,4%; 3)			
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 2	-	-	-
	(70,5%; 5)			
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3			
<i>S. barbatus</i>	(17,6%; 1)			
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 1	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3
	(6,6%; 1)	(33,3%; 2)	(62%; 2)	(57,1%; 2)
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 2	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 4
	(6,6%; 2)	(5,5%; 1)	(6,8%; 2)	(14,2%; 1)
	<i>Gyrodactylus</i> sp. n. 3			
	(6,6%; 2)			

**Tabela 2**

Valores médios das distâncias morfométricas de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus* coletados na bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil. As medidas são apresentadas em centímetros. Os números indicam, respectivamente, a média e o intervalo de confiança de 95% (entre parênteses).

Variáveis	<i>Scleromystax barbatus</i> (*)	<i>Scleromystax barbatus</i> (**)	<i>Scleromystax macropterus</i>
Comprimento do focinho	0,7 (0,6-0,8)	0,6 (0,6-0,7)	0,4 (0,3-0,4)
Comprimento da cabeça	1,3 (1,2-1,5)	1,2 (1,1-1,3)	0,9 (0,9-1,0)
Distância pré-dorsal	1,9 (1,7-2,0)	1,7 (1,6-1,9)	1,3 (1,2-1,5)
Altura do corpo	1,3 (1,2-1,4)	1,2 (1,1-1,3)	1,0 (0,9-1,1)
Comprimento da base da nadadeira dorsal	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,8-0,9)	0,6 (0,6-0,6)
Distância entre a nadadeira dorsal e adiposa	1,0 (0,9-1,2)	1,0 (0,9-1,1)	0,7 (0,6-0,7)
Comprimento da base da nadadeira anal	0,4 (0,4-0,5)	0,5 (0,4-0,5)	0,4 (0,4-0,5)
Altura do pedúnculo caudal	0,6 (0,5-0,6)	0,6 (0,5-0,6)	0,5 (0,5-0,6)
Comprimento padrão	4,9 (4,4-5,3)	4,5 (4,1-4,8)	3,3 (3,1-3,6)

(\*) Espécimes coletados na sub-bacia da baía de Paranaguá.

(\*\*) Espécimes coletados na sub-bacia da baía do rio Nhundiaquara.

**Tabela 3**

Autovalores da matriz de covariância da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*.

Fator	Autovalores	% Variação total	Autovalor cumulativo	% Cumulativa
1	0,64	85,7	0,64	85,7
2	0,06	8,2	0,70	93,9
3	0,02	2,1	0,71	96,0
4	0,01	1,4	0,72	97,3
5	0,01	1,0	0,73	98,3
6	0,01	0,9	0,74	99,2
7	0,00	0,4	0,74	99,6
8	0,00	0,3	0,74	99,9
9	0,00	0,1	0,74	100,0

**Tabela 4**

Escores da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*.

Variáveis	Fator 1	Fator 2
Distância pré-dorsal (DPD)	-0,97	-0,06
Comprimento do focinho (CF)	-0,91	-0,37
Comprimento da cabeça (CC)	-0,95	-0,10
Altura do corpo (AC)	-0,98	0,04
Comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)	-0,94	0,19
Comprimento padrão (CP)	-0,99	-0,10
Distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (DDAD)	-0,95	-0,04
Comprimento da base da nadadeira anal (CBA)	-0,74	0,63
Altura do pedúnculo caudal (APC)	-0,89	0,32



**Tabela 5**

Análise discriminante das distâncias morfométricas de *Scleromystax macropterus* e *Scleromystax barbatus*. (Wilks'  $\lambda = 0,2$ ;  $F = 53,61$ ;  $P < 0,001$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' $\lambda$	Tolerância	$F$	$P$
Comprimento do focinho (CF)	1	0,22	0,18	80,28	< 0,001
Altura do pedúnculo caudal (APC)	2	0,29	0,07	101,15	< 0,001
Comprimento padrão (CP)	3	0,25	0,03	86,83	< 0,001
Comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)	4	0,24	0,11	71,07	< 0,001
Altura do corpo (AC)	5	0,22	0,03	62,98	< 0,001
Comprimento da base da nadadeira anal (CBA)	6	0,21	0,24	53,61	< 0,001

**Tabela 6**

Autovalores da matriz de covariância da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de populações de *Scleromystax barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara, Paraná, Brasil.

Fator	Autovalores	% Variação total	Autovalor cumulativo	% Cumulativa
1	0,58	87,5	0,58	87,5
2	0,04	6,3	0,62	93,9
3	0,02	2,4	0,63	96,2
4	0,01	1,2	0,64	97,4
5	0,01	0,9	0,65	98,3
6	0,00	0,7	0,65	99,0
7	0,00	0,6	0,65	99,6
8	0,00	0,3	0,66	99,9
9	0,00	0,1	0,66	100,0

**Tabela 7**

Escores da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de populações de *Scleromystax barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara, Paraná, Brasil.

Variáveis	Fator 1	Fator 2
Distância pré-dorsal (DPD)	-0,97	-0,08
Comprimento do focinho (CF)	-0,91	-0,31
Comprimento da cabeça (CC)	-0,94	-0,16
Altura do corpo (AC)	-0,98	-0,06
Comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)	-0,95	0,20
Comprimento padrão (CP)	-0,98	-0,12
Distância entre as nadadeiras dorsal e adiposa (DDAD)	-0,93	-0,14
Comprimento da base da nadadeira anal (CBA)	-0,84	0,52
Altura do pedúnculo caudal (APC)	-0,97	0,05

**Tabela 8**

Análise multivariada de variância (MANOVA) das distâncias morfométricas de *Scleromystax barbatus* entre populações coletadas em diferentes sub-bacias e rios da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil.

Variáveis	Wilks' lambda	<i>F</i>	<i>P</i>
Sub-bacias (baía de Paranaguá versus rio Nhundiaquara)	0,28	15,46	< 0,001
Rios (entre os rios amostrados)	0,18	7,85	< 0,001

**Tabela 9**

Análise discriminante das distâncias morfométricas de populações de *Scleromystax barbatus*. O resultado dessa análise permitiu distinguir populações de *S. barbatus* da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (Wilks' lambda = 0,28;  $F = 20,48$ ;  $P < 0,001$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' lambda	Tolerância	$F$	$P$
Comprimento da base da nadadeira anal (CBA)	1	0,31	0,20	7,28	< 0,01
Comprimento padrão (CP)	2	0,30	0,02	27,32	< 0,001
Altura do pedúnculo caudal (APC)	3	0,45	0,04	36,94	< 0,001
Altura do corpo (AC)	4	0,31	0,02	29,59	< 0,001
Comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)	5	0,32	0,07	27,92	< 0,001
Distância pré-dorsal (DPD)	6	0,28	0,07	23,68	< 0,001
Comprimento da cabeça (CC)	7	0,28	0,12	20,48	< 0,001

**Tabela 10**

Análise discriminante das distâncias morfométricas de populações de *Scleromystax barbatus*. O resultado dessa análise permitiu distinguir populações de *S. barbatus* entre rios distintos da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (Wilks' lambda = 0,18;  $F = 10,29$ ;  $P < 0,001$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' lambda	Tolerância	$F$	$P$
Comprimento da base da nadadeira anal (CBA)	1	0,20	0,19	4,32	< 0,05
Comprimento padrão (CP)	2	0,22	0,02	11,92	< 0,001
Altura do pedúnculo caudal (APC)	3	0,30	0,04	14,58	< 0,001
Comprimento do focinho (CF)	4	0,22	0,11	14,20	< 0,001
Distância pré-dorsal (DPD)	5	0,20	0,06	12,31	< 0,001
Comprimento da base da nadadeira dorsal (CBD)	6	0,22	0,08	10,80	< 0,001
Altura do corpo (AC)	7	0,21	0,02	10,29	< 0,001

**Tabela 11**

Autovalores da matriz de correlação da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara, Paraná, Brasil.

Fator	Autovalores	% Variação	Autovalor	% Cumulativa
		total	cumulativo	
1	3,52	39,2	3,52	39,2
2	1,55	17,2	5,07	56,4
3	1,21	13,4	6,28	69,8
4	0,91	10,1	7,19	79,9
5	0,71	7,9	7,91	87,8
6	0,48	5,3	8,38	93,1
7	0,44	4,9	8,83	98,1
8	0,11	1,2	8,93	99,2
9	0,07	0,8	9,00	100,0

**Tabela 12**

Escores da análise de componentes principais (PCA) das distâncias morfométricas de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara, Paraná, Brasil.

Variáveis	Fator 1	Fator 2
Abertura da ponta da âncora (APA)	0,69	0,13
Largura da lâmina da âncora (LLA)	0,67	-0,02
Comprimento da curva interna da âncora (CCIA)	-0,70	-0,50
Ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA)	-0,74	-0,55
Comprimento total da âncora (CTA)	0,52	-0,26
Comprimento da haste do gancho (CHG)	0,33	-0,21
Comprimento da cabeça do gancho (CCG)	0,76	-0,54
Largura distal do gancho (LDG)	0,09	0,66
Abertura da ponta do gancho (APG)	0,76	-0,38



**Tabela 13**

Análise multivariada de variância (MANOVA) das distâncias morfométricas de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3 coletadas em diferentes sub-bacias e rios da bacia litorânea do estado do Paraná, Brasil.

Variáveis	Wilks' lambda	<i>F</i>	<i>P</i>
Sub-bacias (baía de Paranaguá versus rio Nhundiaquara)	0,68	2,5	< 0,05
Rios (entre os rios amostrados)	0,41	2,9	< 0,001

**Tabela 14**

Análise discriminante das distâncias morfométricas de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3. O resultado dessa análise permitiu distinguir suprapopulações da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (Wilks' lambda = 0,71;  $F = 5,27$ ;  $P < 0,01$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' lambda	Tolerância	$F$	$P$
Comprimento da curva interna da âncora (CCIA)	1	0,88	0,91	15,20	< 0,001
Largura distal do gancho (LDG)	2	0,77	0,92	9,06	< 0,001
Largura da lâmina da âncora (LLA)	3	0,75	0,70	6,41	< 0,001
Abertura da ponta do gancho (APG)	4	0,74	0,75	5,27	< 0,01

**Tabela 15**

Análise discriminante das distâncias morfométricas de suprapopulações de *Gyrodactylus* n.sp. 3. O resultado dessa análise permitiu distinguir suprapopulações de rios distintos da sub-bacia da baía de Paranaguá e da sub-bacia do rio Nhundiaquara. (Wilks' lambda = 0,47;  $F = 5,85$ ;  $P < 0,001$ ).

Variáveis	Passos na análise	Wilks' lambda	Tolerância	$F$	$P$
Ângulo de abertura da ponta da âncora (AAPA)	1	0,55	0,22	15,37	< 0,001
Comprimento da curva interna da âncora (CCIA)	2	0,54	0,22	9,07	< 0,001
Largura distal do gancho (LDG)	3	0,53	0,94	7,02	< 0,001
Comprimento da haste do gancho (CHG)	4	0,51	0,95	5,85	< 0,001

**Tabela 16**

Divergência nucleotídica (em proporção de sítios variáveis) entre quatro espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*. Os valores indicam, respectivamente, distância genética baseada em citocromo oxidase II (COII), zinco metaloproteinase (ZMP) e espaçador transcrito interno 1 (ITS1)–ITS2.

Espécie	(1)	(2)	(3)
(1) <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 1	-		
(2) <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 2	0,15 / 0,17 / 0,29	-	
(3) <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3	0,22 / 0,17 / 0,29	0,20 / 0,02 / 0,03	-
(4) <i>Gyrodactylus</i> n.sp. 4	0,20 / * / 0,29	0,21 / * / 0,31	0,26 / * / 0,31

\* Dados não disponíveis.

**Tabela 17**

Tamanho de fragmentos de éxons e íntron do gene ZMP de três espécies de *Gyrodactylus* de *Scleromystax barbatus* e *Scleromystax macropterus*.

Espécie	1°. Éxon	Íntron	2°. Éxon	Total
<i>Gyrodactylus</i> n.sp. 1	63 pb	196 pb	87 pb	346 pb
<i>Gyrodactylus</i> n.sp. 2	63 pb	172 pb	84 pb	319 pb
<i>Gyrodactylus</i> n.sp. 3	63 pb	165 pb	84 pb	312 pb

**Tabela 18**

Teste de neutralidade baseado nos códons de citocromo oxidase II (COII) de haplótipos de quatro espécies de *Gyrodactylus*. Os valores representam índice  $P$  da probabilidade de rejeitar a hipótese nula de neutralidade estrita em COII, segundo método de Nei-Gojobori. Valores em negrito são considerados significativos ( $P < 0,05$ ). Veja a legenda para identificação dos haplótipos.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37
H1	-																																				
H2	0,65	-																																			
H3	0,49	0,96	-																																		
H4	0,39	0,38	0,06	-																																	
H5	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	-																																
H6	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,15	-																															
H7	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,30	0,33	-																														
H8	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,88	0,46	0,66	-																													
H9	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,32	0,21	0,28	0,55	-																												
H10	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,24	0,15	0,21	0,22	0,08	-																											
H11	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,17	0,10	0,15	0,32	0,14	0,31	-																										
H12	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,24	0,15	0,21	0,22	0,08	1,00	0,31	-																									
H13	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	-																								
H14	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,08	-																							
H15	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	0,29	-																						
H16	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	0,29	1,00	-																					
H17	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,08	1,00	0,29	0,29	-																				
H18	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	0,69	0,15	0,15	0,69	-																			
H19	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,01</b>	0,21	0,47	0,47	0,21	0,47	-																		
H20	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	0,69	0,16	0,16	0,69	0,14	0,47	-																	
H21	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	0,48	0,31	0,31	0,48	0,31	0,29	0,30	-																
H22	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,05	0,31	0,48	0,48	0,31	0,47	0,13	0,48	0,29	-															
H23	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>	0,48	0,31	0,31	0,48	0,31	0,29	0,30	1,00	0,29	-														
H24	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	-													
H25	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,31	-											
H26	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,74	0,32	-							
H27	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>		

↓



Haplótipos: H1–H4 = *Gyrodactylus* n.sp.4; H5–H12 = *Gyrodactylus* n.sp.1; H13–H23 = *Gyrodactylus* n.sp.2; H24–H38 = *Gyrodactylus* n.sp.3.